

# 成人T細胞白血病リンパ腫（ATLL）における Carbonic Anhydrase IX（CA9）の造腫瘍性に関する 研究

著者	那須 健太郎
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	11301甲第16856号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00096857">http://hdl.handle.net/10097/00096857</a>

博士論文

成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATLL）における  
Carbonic Anhydrase IX (CA9)の造腫瘍性に関する研究

東北大学大学院医学系研究科医科学専攻

内科病態学講座 血液・免疫病学分野

那須 健太郎

## 目次

1. 略語	2
2. 要旨	4
3. 研究背景	6
4. 研究目的	9
5. 研究方法	10
6. 研究結果	20
7. 考察	26
8. 結論	31
9. 文献	32
10. 表	41
11. 図の説明	43
12. 図	48
13. 基礎論文	62
14. 謝辞	63

## 1. 略語

APC:allophycocyanin

ATLL:adult T-cell leukemia/lymphoma

BMP6:bone morphogenic protein 6 (BMP6)

cDNA:complementary DNA

CGH:comparative genomic hybridization

CIC:cancer initiating cell

CSC:cancer stem cell

DAPI:4'6-diamidino-2-phenylindole

ELISA:enzyme-linked immunosorbent assay

FACS:fluorescence activated cell sorting

FBS:fetal bovine serum

FITC:fluorescein isothiocyanate

HEPES:4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HGF:hepatocyte growth factor

HRP:horseradish peroxidase

HSC:hematopoetic stem cell

HTLV-I: human T-cell leukemia virus type I

IHC:immunohistochemistry

NOD-SCID: non-obese diabetic/severe combined immunodeficient

NOG :NOD/SCID/IL-2R  $\gamma^{\text{null}}$

ORF: open reading frame

PBS(-):  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ -free phosphate buffered saline

PCR: polymerase chain reaction

PE: phycoerythrin

PBMC: peripheral blood mononuclear cell

PVDF: polyvinylidene difluoride

RT-PCR: reverse transcription PCR

qPCR: quantitative PCR

shRNA: small hairpin RNA

siRNA: small interfering RNA

$\text{T}_{\text{SCM}}$ : T memory stem cell

## 2. 要旨

成人T細胞白血病/リンパ腫(ATLL, adult T-cell leukemia/lymphoma)はHTLV-I (human T-cell leukemia virus type I)感染に起因する予後不良な血液腫瘍である。ウイルス感染からATLL発症までには数十年を要するが、その間の発症、悪性化の機序については、未だ不明な点が多く残されている。本研究では、免疫不全NOGマウスにおける造腫瘍性を指標として、ATLLの造腫瘍性亢進に関わる機能分子の同定を試みた。

ATLL由来細胞株ST1から樹立されたST1亜株ST1-N6は、NOGマウスに累代移植することで得られた造腫瘍性が高い株である。ST1-N6細胞と親ST1細胞に発現する遺伝子についてマイクロアレイを用いて比較解析したところ、炭酸脱水酵素CA9(carbonic anhydrase IX)の発現がST1-N6細胞で著しく増強していた。この結果を基に、ST1細胞からフローサイトメトリーを用いて、CA9高発現細胞と低発現細胞とをそれぞれ分画し、ST1-CA9<sup>high</sup>細胞株とST1-CA9<sup>low</sup>細胞株を樹立した。これらST1亜株をNOGマウスに皮下移植したところ、ST1-CA9<sup>high</sup>細胞はST1-CA9<sup>low</sup>細胞および親ST1細胞と比較して、より高い造腫瘍性を示した。さらに、CA9の発現を特異的に抑制するshRNAをST1-CA9<sup>high</sup>細胞に導入すると、造腫瘍性が明らかに低下した。また、ST1細胞ならびに別のATLL由来細胞株であるTL-Om1細胞に対して野生型CA9発現ベクターを導入したところ、両細胞株で造腫瘍性の増強を認めた。さらに、ST1細胞ならびにST1-CA9<sup>low</sup>細胞のNOGマウス移植で得られた腫瘍細胞のCA9発現を解析したところ、いずれにおいても移植前よりも明らかに発現が上昇していることが確認できた。次に、変異型CA9をST1細胞へ導入したところ、CA9酵素活

性欠失変異型とプロテオグリカン領域欠失変異型はいずれも野生型 CA9 に比べて、造腫瘍性が低いことが確かめられた。また、細胞内領域欠失変異型は野生型 CA9 と同様に高い造腫瘍性を示した。このことから、CA9 酵素活性ならびにプロテオグリカン領域がいずれも造腫瘍性に関わり、細胞内領域は造腫瘍性には関与していないことが明らかになった。

さらに、ATLL 原発腫瘍について CA9 発現を調べたところ、リンパ腫型6例中2例において CA9 発現がん細胞の存在が認められた。また、血清中 CA9 濃度を測定したところ、健常人よりも ATLL 患者において高い傾向がみられた。

以上のことから、ATLL 由来 ST1 細胞の造腫瘍性に CA9 が深く関わっていることが明らかであり、ATLL 原発腫瘍における CA9 発現と悪性形質との関連性が示唆された。

### 3. 研究背景

ATLL は我が国において同定された予後不良な成熟 T 細胞性腫瘍であり[1], また, その原因ウイルス (HTLV-I) の存在も我が国において初めて報告された疾患である[2]. 世界的にみても日本の南西部は HTLV-1 キャリアならびに ATLL の好発地域として知られ[3], 我が国では HTLV-1 キャリア中男性で 6.6%, 女性で 2.1%が ATLL を発症すると報告されている[4]. ATLL は急性型, リンパ腫型, 慢性型, くすぶり型, の 4 型に分けられ, いずれも決定的な治療法は確立しておらず, 特に急性型とリンパ腫型は予後不良とされる[5, 6].

HTLV-I 感染は ATLL の発症に決定的な役割を担うものの, HTLV-I 感染から発症までには数十年を要し, この間に宿主ゲノムの変異 (ジェネティックならびにエピジェネティック) が蓄積する可能性が推察され, その解析も進められてきた[7, 8]. 例えば, CDKN2A ファミリー (p15 and p16), p53, Rb, Fas 遺伝子の欠失もしくは変異が ATLL 細胞で同定され, これらの遺伝子異常と予後との関連では, 特に急激な転化をたどるものほど変異頻度が高いことが示されている[9-12]. また, BCL11B, CARMA1 の遺伝子増幅がそれぞれ急性型, リンパ腫型 ATLL においてみられ[13], c-Met 遺伝子の発現上昇が急性型 ATLL においてみられている[14, 15]. 他方, DNA メチル化解析から, CDKN2A や BMP6 におけるエピジェネティックな変異が悪性度の高い ATLL において認められている[16, 17]. さらに, HTLV-I 感染 T 細胞および ATLL 細胞においては, IL-2 に起因するテロメラーゼの活性化を誘導する NF- $\kappa$ B, JAK/STAT および PI3K/AKT/mTOR 関連のシグナル経路の活性化が報告されている[18]. また, ATLL 原発腫瘍では, ポリコーム群分子に関連し発現する miR-31 の発現低下が NF-



$\kappa$  B 活性化を誘導している可能性も示されている[19]. このように ATLL の発症・進展に関わる可能性が考えられる遺伝子異常やシグナル異常について多くの知見が得られている.

腫瘍の発生・進展あるいは悪性形質に決定的な役割を担うがん幹細胞(CSC)/がん起始細胞(CIC)の存在は, 免疫不全 NOD/SCID マウスでの造腫瘍性を指標として, 急性骨髄性白血病(AML)において初めて証明された[20]. その後, 様々なヒトがん腫においても CSC の存在が報告されている[21]. 今回実験に用いた NOG (NOD/SCID/IL-2R  $\gamma^{\text{null}}$ ) マウスも NOD/SCID マウスと同様に重度な複合型免疫不全を呈するマウスであり, ヒト造血幹細胞移植によって造血系や免疫系のヒト化マウスとして活用されている[22, 23]. 特に EB ウイルス, HIV, HTLV-I ウイルスの感染動物モデルとして, ヒト感染症の研究に利用されているほか, すでに大腸, 下咽頭, 胆管, 膵臓などのヒトがん種の CSC 同定に活用されている[24-27].

ATLL の CSC についても, ATLL 由来細胞および HTLV-I 感染細胞の NOG マウスへの移植系を用いて検証されているが, 現時点ではその同定には至っていない[28]. 他方, Tax 遺伝子導入 ATLL マウスモデルにおいて, がん幹細胞様分画が認められており[29], また, ATLL 細胞株においても IFN  $\alpha$  および抗がん剤に抵抗性を示す CSC 様細胞分画の存在が報告されている[30]. さらに, ATLL 由来細胞を上皮細胞と混合培養することによって CSC マーカーの一つとされる CD44 の発現誘導と NK 細胞活性化を誘導する NKG2 の発現抑制がみられることが報告されている[31]. また, ATLL 患者の血清中に可溶性 CD44 が検出され, 急性型 ATLL 患者において高い値を示すことから, ATLL 悪性度との関連が示唆されている[32]. 他方, 興味深いことに, ATLL 原発腫瘍の中に CD45RA<sup>+</sup>T メモリー幹細胞(T<sub>SCM</sub>)

様分画が存在し, この細胞分画が NOG マウスで造腫瘍性を示すことが報告されている[33].

これらの報告は ATLL においても悪性形質を有する CSC 様細胞が存在する可能性を示唆している.

私が所属する研究グループは, ATLL 由来細胞株 ST1 を NOG マウスに累代移植して樹立した ST1-N6 細胞が親 ST1 細胞に比べて造腫瘍性において著しく亢進していることをすでに明らかにしている(山口ら, 論文投稿中). この点に着目して, 本研究では ST1 細胞と ST1-N6 細胞間で遺伝子発現の違いを解析し, ST1-N6 細胞に高発現する遺伝子を同定することにより, ATLL の造腫瘍性の亢進に重要な遺伝子およびその機序を明らかにすることとした.

#### 4. 研究目的

本研究の目的は、高造腫瘍性 ATLL 由来細胞株の遺伝子発現プロファイルおよび免疫不全 NOG マウスにおける造腫瘍性をもとに ATLL の造腫瘍性の亢進に重要な遺伝子を同定し、臨床的意義を明らかにすることである。

## 5. 研究方法

### 臨床検体

ATLL 患者および健常人の単核球(PBMCs)検体およびパラフィン包埋切片検体等のヒト組織の採集に際しては、宮城県立がんセンター倫理委員会の承認(受付番号 27-67)を受けると共に、委員会により定められた利用法の細則に準拠して行った。研究目的や意義等を十分に説明した後、インフォームドコンセントが得られた検体のみを使用した。

### 細胞培養

本研究で用いた ST1 細胞は山田らが樹立した ATLL 由来細胞株である[34]。ST1-N6, ST1-N7, ST1-N8, ST1-N9 細胞は、ST1 細胞を免疫不全 NOG マウスでそれぞれ6～9代継代移植することによって樹立した ST1 亜株である(山口ら, 論文投稿中)。ST1 細胞および ST1 亜株細胞の培養は、10%FBS(Gibco, Grand Island, NY)および penicillin/streptomycin (ナカライテスク, 東京, 日本) を添加した RPMI-1640 培地を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 湿潤環境にて培養した。培養中の細胞濃度は  $1 \sim 8 \times 10^5 / \text{mL}$  の範囲に調整した。また、TL-Om1 細胞は菅村らが樹立した ATLL 由来細胞株であり[35], ST1 細胞と同様にして培養した。また、Plat A 細胞は、10%FBS および penicillin/streptomycin 添加 DMEM 培地を用いて、37°C, 5% CO<sub>2</sub> 湿潤環境にて培養した。

## 低酸素チャンバーにおける細胞培養

低酸素下での細胞培養は、細胞数  $2 \times 10^5$  /mL となるように調整し、低酸素チャンバー 9000EX (和研薬, 京都, 日本) を用いて  $37^\circ\text{C}$ ,  $1\%\text{O}_2$ ,  $5\%\text{CO}_2$  環境下で行った。経時的に細胞カウントを行うために、同一条件の培養フラスコを複数個用意して、一度細胞カウントに使用したフラスコは廃棄した。培養液と等量の  $0.4\%$  トリパンプルー溶液 (和光, 東京, 日本) とを混合した後、血球計算盤 (Burker-Turk 型) にて生細胞数を計測した。

## NOG マウスの取り扱いおよび造腫瘍性の評価

NOGマウスは公益財団法人実験動物中央研究所 (川崎, 日本) より購入し、1週間以上の馴化期間を経たマウスを使用した (週齢8~10週)。実験動物の扱いや実験方法に関しては、宮城県立がんセンター実験動物倫理委員会の承認を受けた。

細胞をRPMI-1640培地に懸濁し、実験によっては等量のMatrigel (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ) と混和し、NOGマウスの両側の皮下に移植した。移植部位あたりの細胞数は図4Aの実験に関しては  $1 \times 10^6$  個 (マトリゲル非存在下) で、図7Hの実験は  $1 \times 10^2$  個 (マトリゲル存在下)、その他の実験は  $1 \times 10^4$  個 (マトリゲル存在下) で行った。移植したマウスでは約1週間毎に腫瘍径を計測し、腫瘍体積は次の式で算出した。

$$\text{最大径} \times \text{最小径}^2 / 2$$

それぞれの検体あたり6ヶ所に移植し、腫瘍体積の平均値を算出した。

## マイクロアレイによる遺伝子発現の分析

対数増殖期の ST1 細胞, ST1-N6 ~ N9 細胞より全 RNA を mirVana miRNA Isolation kit (Life Technologies, Carlsbad, CA) によって抽出し, Low Input Quick Amp Labeling kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)にて蛍光標識した. 標識されたプローブを SurePrint G3 Human GE 8×60K microarray slide (Agilent Technologies)に滴下し, Agilent 社のプロトコルに沿ってハイブリダイゼーションを行った. スライドを洗浄後, ハイブリダイズしたプローブの蛍光を Agilent microarray scanner により計測した. データは Feature Extraction Software (Agilent Technologies)にて処理したのち, R packages を使用しランクプロダクト法 [36]にて解析を行い, 遺伝子発現の順位付けを行った.

## 定量 RT-PCR

全 RNA を RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA)にて抽出した. これを鋳型に PrimeScript II cDNA synthesis kit (タカラバイオ, 草津, 日本)を用いて cDNA を合成した. cDNA をプライマーおよび Brilliant III Ultra-Fast SYBR Green QPCR Master mix (Agilent Technologies) と混合し, PCR 反応を行った(95°C, 3min を 1 サイクル後 95°C5 秒-60°C10 秒を 40 サイクル). PCR 反応, 増幅産物の計測および解析は LC480 II (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)にて行った.  $\beta$ -actin を内部標準として用いた. PCR 反応には以下のプライマーを用いた.

CA9 に対しては(5'-CCTTTGCCAGAGTTGACGAG-3',

5'-GCAACTGCTCATAGGCACTG-3'),

$\beta$ -actin に対しては (5'-CTAAGGCCAACCGTGAAAAG-3',

5'-CCCGTAGTCAGATAGCTTGATGTTGATGTG-3')

### フローサイトメトリーおよびセルソーティング

Canto II (BD Biosciences)を用いてフローサイトメトリーの測定を行った。細胞は 2%FBS 添加 PBS(-)で洗浄し、それぞれの蛍光標識抗体と 4°Cで 30 分間反応させ、再度 2%FBS 添加 PBS(-)で洗浄し、解析した。細胞ソーティングの際は、2%FBS 添加 PBS(-)で洗浄後、それぞれの蛍光標識抗体を 30 分間室温で反応させ、FACS Aria II (BD Biosciences)を用いて測定及びソーティングを行った。また、ソーティングの際は比較対象の元株 ST1に関しても細胞選択を行わずに FACS Aria II に通し、ソーティングした他の細胞とともに次以降の実験に用いた。結果は FlowJo software V10(Tree Star, Ashland, OR)を用いて解析した。使用した抗体は以下のとおりである。APC 結合マウスモノクローナル抗ヒト CA9 抗体 (R&D systems, Minneapolis, MN エピトープ部位:Pro59-Asp414), PE 結合マウスモノクローナル抗ヒト CD4 抗体 (clone: RPA-T4, BD Pharmingen, San Diego, CA), FITC 結合マウスモノクローナル抗ヒト CD25 抗体 (clone: M-A251, BD Pharmingen, San Diego, CA), APC 結合マウスモノクローナル抗ヒト CD44 抗体 (clone:G44-26, BD Pharmingen, San Diego, CA), PE 結合マウスモノクローナル抗ヒト CD45RA 抗体(clone: HI100, BioLegend, San Diego, CA)を目

的とする抗原の検出に用いた. APC 結合マウス IgG (clone: MOPC-173, BioLegend, San Diego, CA) , PE 結合マウス IgG (clone: MOPC-21, BioLegend) , および FITC 結合マウス IgG (clone: MOPC-21, BioLegend) を Isotype control として用いた. 7-AAD (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を死細胞の検出に用いた.

### ELISA 法による血清および細胞培養液中の CA9 濃度の測定

細胞培養液中および血清中の CA9 濃度は Quantikine® ELISA kit for Human Carbonic Anhydrase IX (R&D systems, Minneapolis, MN)にて行った. 細胞( $1 \times 10^5$ /mL) を 48 時間培養し, 培養液を遠心( $12,000 \times g$ , 5 min at 4°C)後、その上清を測定に用いた.

### レトロウイルスベクターによる遺伝子導入

野生型ならびに変異型 CA9 の遺伝子発現ベクターを以下のようにして調製した. 先ず, ST1細胞の全 RNA を RNeasy Mini kit (Qiagen, Valencia, CA)にて抽出した. これを鋳型として PrimeScript II cDNA synthesis kit (タカラバイオ)を用いて cDNA を合成した. これに対してヒト CA9 の ORF 配列を KOD Fx polymerase (東洋紡, 大津, 日本)を用いた PCR にて増幅した. PCR には以下の primer を用いた.

5'-ATGCGGCCGCACCATGGCTCCCCTGTGCCCCAG-3' および

5'-ATGCGGCCGCCTAGGCTCCAGTCTCGGCTA-3'である.



PCR 反応は、最初の熱変性は 94°C, 2 分で行い、その後 98°C, 10 秒–65°C, 30 秒–68°C, 90 秒を 35 サイクルで行った。増幅産物はアガロースゲル電気泳動後 Wizard gel purification kit (Promega, Madison, WI)にて精製し、pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) の NotI 切断部位にサブクローニングし、pBlue-CA9-35 を得た。シーケンスを確認後、CA9 配列を NotI により切り出し、これを pMXs puro (東京大学北村俊雄先生より供与)の NotI 部位に挿入し pMXs-CA9 を得た。これを野生型 CA9 発現ベクター (CA9wt)とした。次に CA9 のプロテオグリカン領域に対応する DNA 配列を欠失させるために、5'-GGGCAACCTCTGGGGATGGA-3' と 5'-AGGGACAAAGAAGGGGATGA-3' をプライマーとし、pBlue-CA9-35 を鋳型とした PCR を行い、プラスミド全周を増幅した。PCR 反応には KOD Fx を用い、反応は最初の熱変性を 94°C, 5 分間行い、その後 98°C, 10 秒–50°C, 30 秒–68°C, 270 秒を 25 サイクル行なった。反応産物をゲル電気泳動後回収し、polynucleotide kinase を添加した ligation 反応により末端リン酸化および環状化を行なった後、大腸菌に導入し、プロテオグリカン領域欠失 CA9cDNA を得た。同様に、細胞内領域をコードする DNA 配列を欠失させるため、5'-TCTCATCTGCACAAGGAACG-3', 5'-GTAGCCGAGACTGGAGCCTAG-3'をプライマーに用いた PCR を行い、同様のクローニングを行い、細胞内領域欠失 CA9cDNA を得た。これら変異体の DNA 配列を確認後に、上記と同様に pMXs-puro に挿入し、それぞれの発現ベクター (CA9 $\Delta$ PG および CA9 $\Delta$ IC)を調製した。さらに、同様に CA9 のアミノ酸残基、238E と 333T が酵素活性に必須と報告されていることから[37, 38], これらに変異を導入した。これらアミノ酸残基をそれぞれ

れアラニンに置換するため、最初に 5'-CGCCGAGCCCGGACGACCTG-3'と 5'-CACACTGTGGAAGGCCACCGT-3'をプライマーとし、pBlue-CA9-35 を鋳型とした PCR を行い、プラスミド全周を増幅し、E238A 変異体を作成した。さらに、これを鋳型に、 5'-TGCAGTCAGAGACCCCTCATA-3'と 5'-CCGCCCTGTGCCCAGGGTGTC-3'をプライマーに用いた PCR を行い、E238A/T333A の二重変異体を作成した。DNA 配列確認後に、この変異体を pMXs-puro の NotI 部位に挿入し、E238A/T333A-CA9 変異体発現ベクター (CA9mt) を調製した。また、shRNA の発現ベクターは pSIREN-RetroQ vector (Clontech, Mountain View, CA) を元に作製した。ヒト CA9 (NM\_001216) 配列の 890-908 (5'-CGGAAGAAAACAGTGCCTA-3', shCA9-1) と 333-351 (5'-AGTTAAGCCTAAATCAGAA-3', shCA9-2) を標的とした shRNA 発現ベクターを作製し、firefly luciferase に対する shRNA 発現ベクター (Clontech) をコントロールベクター (SIREN) として用いた。

CA9 発現ベクター (CA9wt, CA9mt, CA9ΔPG, CA9ΔIC) ならびに shRNA 発現ベクター (shCA9-1, shCA9-2) 並びにコントロールベクター (pMX ΔEco, SIREN) を導入したレトロウイルスを調製するために、FuGENE HD transfection reagent (Promega) を用いてベクター DNA を Plat A 細胞株に導入し、導入 48 時間後に培養上清を回収し、0.45 μm シリンジフィルターにて汙過してウイルス液を得た。ウイルス液 (1mL) に細胞 ( $1 \times 10^6$  個/mL) を懸濁し、polybrene (終濃度 4 μg/mL) を加えた後に、6-well plate に移し、遠心 (1,500 × rpm, 90 min, 37°C) して細胞へウイルスを感染させた。感染後 48 時間培養したのち、puromycin (終濃度 2

$\mu$  g/mL, Invitrogen, Carlsbad, CA)を培地に加え, 2 週間程度細胞を継代し puromycin 耐性細胞を選択した. 選択した細胞の CA9 発現はウエスタンブロットおよびフローサイトメトリーにて確認した. 遺伝子導入した細胞を表1にまとめた.

## ウエスタンブロット

細胞を溶解バッファー (50 mM Hepes pH7.5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 2mM EDTA, 10 mM NaF, 2 mM sodiumorthovanadate, 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride, 7.5 mg/mL aprotinin, 10 mg/mL leupeptin) にて溶解し, 遠心 ( $13,200 \times g$ , 20 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ) 後, 上清を回収しサンプルとした. サンプルの蛋白濃度は Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad, Hercules, CA)にて測定した. 等量のサンプルバッファー (125mM pH6.8 Tris-HCl buffer, 4% SDS, 20% glycerol, 0.01% BPB, 0.2M 2-メルカプトエタノール) を加え,  $100^{\circ}\text{C}$  で 5 分間加熱し サンプルとした. 4-20% SDS-ポリアクリルアミドゲル(和光, 大阪, 日本)に各レーンあたり蛋白量  $10 \mu$  g に相当するサンプルを添加し, 電気泳動を行った後, 分離したゲル中の蛋白を転写バッファー (25mM Tris, 192mM glycine, 20%  $\text{CH}_3\text{OH}$ ) 中で, PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA)に転写した(通電条件:100 V, 350mA, 60min, 氷上). membrane は 5%脱脂粉乳(スキムミルク, 明治, 東京, 日本)を含む 0.1% Tween 20-PBS(-) (PBST)でブロッキング処理した. ブロッキングした membrane は, ブロッキング溶液で 1:1000 に希釈したウサギモノクローナル抗ヒト CA9 抗体(clone: D10C10, Cell Signaling Technology, Danvers, MA; エピトープ部位は細胞外領域の Asp361 付近)および CA9 細胞内領域を認識する CA9 抗体

(clone:D47G3, Cell Signaling; エピトープ部位は C 末端領域)と 4°C で一晩反応させた.

membrane は PBST で洗浄後, 1:1000 希釈 HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (#7074P2, Cell Signaling Technology, Danvers, MA)と室温で1時間反応させ, PBST で洗浄後, SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo scientific, Rockford, IL)と反応させて抗体と結合した CA9 を検出した. 検出には LAS-4000mini CCD Imager (富士フイルム, 東京, 日本)を用いた. 各レーンに蛋白が等量泳動, 転写されていることを確認するため, 検出後の membrane からストリッピング溶液(アプロサイエンス, 徳島, 日本)を用いて結合抗体を除き, その後ブロッキングを行い,マウス抗ヒト  $\alpha$ -tubulin モノクローナル抗体(Sigma-Aldrich) を用いて, 上記と同様に  $\alpha$ -tubulin を検出した.

## 免疫組織染色

ATLL 患者リンパ節組織およびマウス腫瘍組織のパラフィン包埋検体より薄切した組織切片 (3  $\mu$  m)を剥離防止コートスライドガラス (PRO-04, 松浪硝子工業株式会社, 岸和田, 日本)に張り付け, キシレンで脱パラフィンを行い, エタノール系列により親水化した. 次に 96°C の pH 9.0 target retrieval solution (Dako, Carpinteria, CA)中に 45 分間浸して抗原賦活化を行った後, 内在性ペルオキシダーゼ活性を除くために 0.3%  $H_2O_2$ を混和したメタノールで室温10分間処理した. 5% ヤギ血清(和光, 東京, 日本)入り TBST (25mM Tris, 150mM NaCl, 0.1% Tween20)にて室温30分間ブロッキングを行い, Antibody diluent with background reducing components(S1699, Dako)にて 1:100 に希釈した抗ヒト CA9 抗体

(clone: D10C10, Cell Signaling Technology) および抗 CD4 抗体 (clone: 1F6, ニチレイバイオサイエンス) および negative control としてウサギ IgG (Cell Signaling Technology)を 4 °C にて一晩反応させた。検体は TBST で洗浄後, HRP 標識 anti-mouse IgG plus tyramide signal amplification kit (Molecular Probes, Eugene, OR) および Alexa 594 抗ウサギ IgG (Molecular Probes)による検出反応を行い, DAPI (Invitrogen)染色を行った後, Antifade Gold (Molecular Probes)で封入した。観察は共焦点顕微鏡(LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany)にて行った。

## 統計解析

各サンプル間の平均値の差を比較するためStudentの $t$ -検定 (両側検定)を用いた。

図10Bにおける各群間の比較はMann-Whitney U検定を行った。

## 6. 研究結果

### ST1-N6 細胞で高発現する CA9 の同定

ST1-N6 細胞の造腫瘍性に関わる遺伝子を検索するために、マイクロアレイを用いて、発現遺伝子の比較を親 ST1 株と ST1 亜株 (ST1-N6, -N7, -N8, -N9) の間で行った。ST1-N6 を含む ST1 亜株はいずれも親 ST1 株に比較して、CA9 をはじめとする複数の遺伝子発現が著明に増強していた (図 1A)。CA9 は膜関連メタロエンザイムであり二酸化炭素と水から重炭酸イオンと水素イオンを生成する反応を可逆的に触媒する膜蛋白質であり (図 2)、これまでがん細胞の生存・増殖、接着、浸潤に関与することが報告されている[39-42]。そこで、本研究では CA9 に焦点を当て、ATLL の造腫瘍性との関連について解析することとした。

まず、CA9 発現の差異を確認するため、ST1 細胞と ST1-N6 細胞に対して CA9 抗体による表面抗原の免疫染色を行い、フローサイトメトリーにて解析した。その結果、ST1-N6 細胞では 95.3% が陽性であったのに対し、ST1 細胞では 4.3% が陽性であった (図 1B)。この結果より、CA9 陽性細胞が選択的に NOG マウスにおいて増殖し、腫瘍を形成していることが示唆された。

### ST1-CA9<sup>high</sup> および ST1CA9<sup>low</sup> 細胞株の樹立

次に、ST1 細胞の造腫瘍性と CA9 発現との関連性を調べるために、ST1 細胞を抗 CA9 抗体で免疫染色し、CA9 発現が高い細胞と低い細胞をフローサイトメトリーを用いてそれぞれ分画した。この分画を 5 回反復して行い、CA9 高発現細胞株 (ST1-CA9<sup>high</sup>) と CA9 低発現細胞株 (ST1-CA9<sup>low</sup>) を樹立した。

胞株 (ST1-CA9<sup>low</sup>) をそれぞれ樹立した(図3A). 次いで, これら2つの細胞株における CA9 の発現を蛋白レベルと mRNA レベルで評価した. フローサイトメトリーでは ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞の 97.7% が CA9 陽性であるのに対して, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞では 3.7% が CA9 陽性であった(図3A). ウェスタンブロットにて CA9 発現を確認したところ, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞において明らかな CA9 蛋白バンドが認められた(図3B). なお, アミノ酸配列から推定される CA9 の分子質量は 58kDa であるが, これより高分子質量のスミア状のバンドは糖鎖付加を受けた CA9 と考えられる[37]. 58kDa 未満のバンドについては, 非特異的な蛋白分子の混入も否定はできないが, 多くは酵素切断を受けた CA9 分子と推定される. 細胞表面の CA9 は細胞膜外で metalloprotease による切断を受け, 細胞外に可溶性分子として産生され, その切断の割合は低酸素環境の有無によらず細胞で産生される CA9 全体の 10% 程度とされることから [43], 細胞培養上清中の CA9 量を ELISA 法にて測定した. その結果, 培養上清中の CA9 量は ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞と親 ST1 細胞よりも ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞および ST1-N6 細胞で明らかに多かった(図3C). さらに, RT-PCR で測定した mRNA 発現においても ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞が ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞や親 ST1 細胞よりも著明に増強していることが分かった (図3D). これらの結果から, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞ならびに ST1-N6 細胞では CA9 発現が蛋白質レベルでも mRNA レベルでも高いことが分かった.

## ST1-CA9<sup>high</sup>細胞は高い造腫瘍性を保持している

次に, ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup> および ST1 細胞をそれぞれ NOG マウスに皮下移植し, 腫瘍形成能を比較した. ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞の移植では移植後4週目で触知可能な腫瘍が認められたのに対して, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞移植では6週目で腫瘍形成が認められた(図4A). 移植後 8 週時点での平均の腫瘍体積は ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞で 2,100 mm<sup>3</sup>であったのに対して, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞では 144mm<sup>3</sup> であり, ST1 細胞では 1.0mm<sup>3</sup> 以下であった. NOG マウスにて形成されたそれぞれの腫瘍を摘出し, トリプシン処理により浮遊細胞を調製して, フローサイトメトリーにて CA9 発現を測定した. ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞由来の腫瘍から得られた細胞の CA9 発現は 92.5%と移植前と同様に高く, また, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞ならびに親 ST1 細胞由来の腫瘍から得られた細胞の CA9 発現はそれぞれ 45.3% と 48.2%であり, 移植前よりも明らかに増加していた(図4B). さらに, ウェスタンブロットにて CA9 発現を比較したところ, 腫瘍由来細胞は移植前の元株細胞よりもいずれも CA9 発現が高いことが確認できた(図4C). これらの結果は CA9 発現と造腫瘍性が相関する可能性を示している.

他方, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞, ST1 細胞について *in vitro* での増殖速度を比較したが, 明らかな差を認めなかった(図5A). 従って, CA9 発現と *in vitro* での細胞増殖速度とは相関しないことが分かった. さらに, CA9 発現が低酸素環境下で細胞増殖に影響する可能性が考えられることから, 低酸素環境下で細胞増殖を比較した. ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞, 親 ST1 細胞間で増殖速度に明らかな差は認められなかった(図5B).



CA9 は ST1 細胞の造腫瘍性において重要な役割を担っている。

次に, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞の造腫瘍性における CA9 の機能的役割について検討した。まず, レトロウイルスベクターを用いて2種類の CA9 遺伝子特異的 shRNA (shCA9-1 と shCA9-2) を ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞に導入し, フローサイトメトリーおよびウエスタンブロットで CA9 発現を調べたところ, いずれの shRNA 導入によっても明らかな CA9 発現抑制が認められた(図6A, 6B)。これら shRNA 導入細胞を NOG マウスに皮下移植し, 造腫瘍性を調べたところ, shRNA 導入によって ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞の造腫瘍性が明らかに抑制された (図6C)。これらの結果は, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞が持つ高い造腫瘍性が CA9 発現に依存していることを示している。

ST1 細胞の造腫瘍性亢進に関わる CA9 の役割をさらに明らかにするために, 野生型 CA9 発現レトロウイルスベクター (CA9wt) および空ベクター (pMXs ΔEco) を ST1 細胞に導入した。CA9wt を導入した ST1 細胞 (ST1/CA9wt 細胞)は, pMXs ΔEco を導入した ST1 細胞(ST1/pMXs ΔEco 細胞)に比較して, より高いCA9 発現を示した(図7A, 7B)。ST1/CA9wt 細胞を NOG マウスに皮下移植したところ, 腫瘍細胞は 4 週以内に触知可能となり, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞と同様に速やかな腫瘍の増大がみられた。一方, ST1/pMXs ΔEco 細胞は5週以降に腫瘍の触知が可能となったが, ST1/CA9wt 細胞に比べて腫瘍増大は明らかに緩徐であった(図7C)。さらに, ST1 細胞の造腫瘍性の亢進に関わる CA9 の機能部位を明らかにするために, 3種類の変異型 CA9 遺伝子, 1) CA9 の酵素活性部位アミノ酸残基, 238E と 333T をアラニンに置換した変異型 CA9(ST1/CA9mt), 2) 細胞外プロテオグリカン領域を欠失した変異型 CA9(ST1/CA9 ΔPG) および細胞内領域を欠失した変異 CA9

(ST1/CA9  $\Delta$ IC)を調製した。これら変異型 CA9 を ST1 細胞へ導入し, ST1/CA9mt 細胞, ST1/CA9  $\Delta$ PG 細胞, ST1/CA9  $\Delta$ IC 細胞および ST1/CA9wt 細胞を調製し,フローサイトメリーおよびウエスタンブロットにて各細胞における CA9 の発現を確認した(図7D, E)。これら細胞をそれぞれ NOG マウスに皮下移植し, 造腫瘍性を比較した。ST1/CA9mt 細胞および ST1/CA9  $\Delta$ PG 細胞では ST1/CA9wt 細胞に比べて, 造腫瘍性が減弱する傾向が認められたが, ST1/CA9  $\Delta$ IC 細胞では ST1/CA9wt 細胞と同等の高い造腫瘍性がみられた(図7F)。

さらに, ST1 細胞以外の ATLL 由来細胞株 TL-Om1 を用いて, CA9 と造腫瘍性との関連を調べた。まず, CA9wt 導入 TL-Om1 (TL-Om1/CA9wt)細胞において CA9 の発現が高いことをフローサイトメリーにて確認した(図 7G)。これら細胞を NOG マウスに皮下移植したところ, TL-Om1/CA9wt 細胞は TL-Om1/pMXs  $\Delta$ Eco 細胞ならびに親 TL-Om1 細胞に比べてより早期の腫瘍形成を示した(図 7H)。

### ST1 細胞における CD44 ならびに CD45RA の発現

従来, ヒト固形腫瘍において CSC マーカーの一つと目される CD44 の発現が ATLL 由来細胞表面や ATLL 患者血清中にみられることが報告されている[31, 32]。そこで, CD44 発現と ST1 細胞の造腫瘍性との関連性を調べた。ST1 細胞における CD44 発現は 2 峰性になることから, CD44 高発現 ST1 細胞と低発現 ST1 細胞とを分画し, それぞれ NOG マウスに皮下移植を行ったところ, これら両細胞分画で造腫瘍性には明らかな有意差はみられなかった(図 8A)。

最近, ATLL 原発腫瘍の中に CD45RA<sup>+</sup>T メモリー幹細胞(T<sub>SCM</sub>)様分画が存在し, この細胞分画に NOG マウスでの造腫瘍性がみられることが報告されている[33]. そこで, 造腫瘍性に違いがある ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞と ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞において CD45RA の発現を比較したところ, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞において発現の亢進が認められた(図 8B). 現在, ST1 細胞から CA9<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup>細胞を分画し, NOG マウスでの造腫瘍性を検討中である.

### ATLL 臨床検体における CA9 陽性がん細胞の検出

ATLL 原発腫瘍における CA9 陽性がん細胞を検出するために, ATLL がん細胞が発現する CD4 と CA9 の二重染色を試みた. 先ず, リンパ腫型 ATLL 患者では, 6症例のリンパ組織検体の中で, 2検体において明らかな CA9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>がん細胞が存在することを認めた(図 9). さらに, 急性型 ATLL 患者および健常人の末梢血から単核球(PBMCs)を単離し, これら細胞における CA9 ならびに CD4 の発現を蛍光免疫染色で調べた. その結果, ATLL 患者の単核球においては僅かに CA9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の存在が確認できたが, 健常人では全く確認できなかった(図10A). また, ATLL 患者および健常人の血清中の CA9濃度を測定したところ, ATLL 患者の CA9 濃度は健常人のそれよりも高い傾向を示し, 特に ATLL-2 患者では血清 CA9 の高値を認めた (図10B).

## 7. 考察

様々なヒトがん細胞を免疫不全 NOG マウスで移植継代することによって、高い造腫瘍性を有する細胞分画の選択が可能であることが報告されてきた[24-27]. この異種移植の方法を用いて山口らは ATLL 由来細胞株 ST1 から ST1-N6 という高い造腫瘍性を示す ST1 亜株を樹立した(山口ら論文投稿中). ST1-N6 は ST1 と比較して複数の遺伝子の発現上昇が認められた(図1). これらの中には, CA9をはじめとして以下のような遺伝子が含まれていた. HIF-1 $\alpha$  経路の下流で代謝に関連するとされる SLC24A3 (GLUT3)[44], 神経芽細胞腫に対して抑制的に作用する NPTX2[45], 細胞接着との関連が示唆され, 高悪性度の乳がんが発現の上昇が確認されている PLEKHA7[46], 悪性黒色腫などで発現の上昇が確認されている MITF[47], 変異により先天性爪甲硬厚症様の症状を呈する KRT75[48], その発現が乳がんや扁平上皮がん等の予後不良と関連があるとされる CFI (complement factor I)[49, 50], ROS 系に関連し, 酸素消費を増強させる働きを担いがん転移浸潤との関わりが示唆されている PPARGC1A[51], リンパ腫のがん遺伝子としての可能性が示唆されている GPM6A[52], その変異が急性骨髄性白血病のリスク因子となる MLLT11[53]などである.

ST1-N6 において著明な発現上昇が認められた CA9 は, 正常消化管組織においても弱い発現がみられる分子であるが, 様々なヒト固形腫瘍組織において過剰発現が認められるとともに予後とも関連することが報告されており[54, 55], 現在治療の標的分子としても注目されている[56]. これらの特性に鑑み, 本研究では CA9 に着目し, ST1 細胞の造腫瘍性との関連性を解析した. その結果, CA9 高発現 ST1 細胞が CA9 低発現 ST1 細胞よりも造腫瘍性

が亢進していること、野生型 CA9 遺伝子導入によって ST1 細胞の造腫瘍性を亢進させること、逆に発現抑制が造腫瘍性を低下させることが明らかとなり、NOG マウスにおける ST1 細胞の造腫瘍性に CA9 が重要な役割を担っていることが示唆された。

先行研究により固形腫瘍における悪性形質発現には CA9 が有する炭酸脱水酵素活性および細胞接着活性が関わっている可能性が示唆されている[39-42, 56]。また B 細胞リンパ腫においては CA9 発現が細胞外酸性環境下の pH 調節に関与することが示されている[57]。加えて、マウス T 細胞性急性リンパ性白血病/リンパ芽球性リンパ腫(T-ALL/LBL)においては CA9 と同じ膜結合型炭酸脱水酵素である CA12 に対する抗体が細胞増殖を抑制し、アポトーシスを誘導することが報告されている[58]。これらの研究から、ST1 細胞における CA9 発現亢進によって細胞内外の pH 調節が促進され、NOG マウスでの腫瘍形成に好適な環境が形成されている可能性が推察される。この点を明らかにするために、本研究では、酵素活性部位点変異 CA9 変異体(CA9mt)ならびにプロテオグリカン領域欠失 CA9 変異体(CA9 $\Delta$ PG)、細胞内領域欠失 CA9 変異体(CA9 $\Delta$ IC)をそれぞれ ST1 細胞に導入し、造腫瘍性誘導能を野生型 CA9(CA9wt)と比較した。その結果、ST1/CA9wt に比べて ST1/CA9mt の造腫瘍性誘導能は低く、CA9 が有する酵素活性すなわち pH 調節機能が造腫瘍性に重要であることが示唆された。また、ST1/CA9 $\Delta$ PG の造腫瘍性誘導能も ST1/CA9wt よりも若干低い傾向があることから、プロテオグリカン領域を介する細胞接着活性も造腫瘍性に影響する可能性も考えられる[59]。一方で、ST1/CA9 $\Delta$ IC については ST1/CA9wt と比較し明らかな造腫瘍性の差を認めなかったことから、細胞内領域は造腫瘍性誘導には必

須ではないと考えられた.

HIF-1  $\alpha$  は低酸素下で分解されにくく, 核内で HIF-1  $\beta$  とのヘテロ二量体を形成し, CBP/p300 と結合し DNA 上の低酸素応答領域 (HRE) に結合し様々な遺伝子を活性化すると考えられており, その一つが CA9 である[60]. そこで, HIF-1  $\alpha$  の発現を ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞と ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞間で比較したところ, HIF-1  $\alpha$  発現はウエスタンブロットにて検出できなかった (未掲載データ). HIF-1  $\alpha$  以外の低酸素誘導因子の影響は依然として除外できないものの, 正常酸素環境下では ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞や ST1-N6 細胞における CA9 高発現は HIF-1  $\alpha$  に依存せず, これら CA9 高発現細胞では CA9 発現抑制機構が減弱している可能性も考えられる. 従来, CA9 発現は転写因子 CREB 活性によって抑制されることが知られているが[61], 本研究で CREB 活性と CA9 発現の関連性を検索したが, 明らかな関連性はみられなかった (未掲載データ). また, DNA メチル化により CA9 の発現上昇が認められる可能性も考えられるが[62], 現時点では ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞や ST1-N6 細胞における CA9 発現の増強機構については依然不明である. さらに, CA9 発現は Tax や HBZ といった HTLV-1 関連遺伝子の発現とも相関しないことをすでに確かめている (未掲載データ).

CD44 はヒト固形腫瘍において CSC マーカー分子の一つとして捉えられている[31]. ATLL においても CD44 発現と ATLL の悪性形質との関連性が報告されていることから[32], ST1 細胞を用いて CD44 発現と NOG マウスでの造腫瘍性との関連を調べたところ, 両者に関連性はみられなかった. 他方, ATLL 原発腫瘍細胞の中に CD45RA 陽性 T メモリー幹細胞 (T<sub>SCM</sub>) 様の細胞分画が存在し, この細胞分画が NOG マウスにおいて原発腫瘍を同じクロ

ーン性増殖を示すのに対して、他の CD45RA 陰性細胞分画ではこのような造腫瘍性が見られないことが報告されている[33]. そこで、CD45RA 発現と造腫瘍性との関連を調べるために、高造腫瘍性 ST1-CA<sup>high</sup> 細胞株と低造腫瘍性 ST1-CA<sup>low</sup> 細胞株における CD45RA 発現を比較した. その結果、ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞における CD45RA 発現がより高いことが分かった. すなわち、高造腫瘍性を有する ST1 細胞では CA9 と CD45RA が共に高発現している可能性が考えられる. この点をさらに明らかにするために、ST1 細胞や ATLL 原発腫瘍における CA9<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup>細胞分画の造腫瘍性を比較検討する必要がある.

他方、ST1-N6 細胞では AKT の恒常的な活性化がみられ、ST1-N6 細胞の高造腫瘍性に AKT 活性化が関与している可能性が考えられた(山口ら、論文投稿中). そこで、ST1-CA<sup>high</sup> 細胞と ST1-CA<sup>low</sup> 細胞の活性化 AKT を調べたところ、両者に明らかな差異はみられなかった(データ未掲載). 従って、ST1-CA<sup>high</sup> 細胞の高造腫瘍性に恒常的な AKT 活性化が関わっている可能性はないものと考えられる.

最後に、ATLL 原発腫瘍の中に CA9 を発現するがん細胞が存在することを確認するために、ATLL 患者由来の末梢単核球とリンパ組織標本について CA9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞を検索した. その結果、少なくとも ATLL リンパ節組織において CA9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>細胞の存在が確認できた. これらの結果は、数的に少ないものの、明らかに ATLL 原発腫瘍の一部、特にリンパ腫型において CA9 発現がん細胞が存在することを示唆している. さらに特記すべき点として、健常人ドナーの血清 CA9 濃度に比べて ATLL 患者血清中の CA9 濃度が高い傾向にあることが分かった. ATLL 患者の1検体(ATLL-2)において突出した CA9 濃度が検出されたが、フローサ

イトメリー上の ATLL がん細胞における CA9 発現とは一致していないことから、CA9 がリンパ腫病変由来である可能性も考えられる. ATLL が血清中 CA9 に及ぼす影響を明確にするためには、症例数を増やし ATLL 病態と CA9 陽性がん細胞や血清中 CA9 濃度との関連性についてさらに検討する必要がある.



## 8. 結論

免疫不全 NOG マウスにおける腫瘍形成を指標として, ATLL 由来細胞株 ST1 の造腫瘍性に炭酸脱水酵素 CA9 が深く関わることを明らかにした. この CA9 の機能には酵素活性に加えて CA9 のプロテオグリカン領域を介する細胞接着活性が重要な役割を果たしている可能性が示唆された. また, ATLL 臨床検体, 特にリンパ腫検体において CA9 発現がん細胞の存在が認められた. これら ATLL 患者にみられる CA9 発現がん細胞が ATLL の悪性形質と関連する可能性が示唆される.

## 9. 文献

- [1] Uchiyama T, Yodoi J, Uchino H et al: Adult T-cell leukemia: Clinical and hematologic fetures of 16 cases. *Blood* 1977;50:481-92
- [2] Hinuma Y, Nagata K, Miyoshi I et al: Adult T-cell leukemia: Antigen in an ATLL cell line and detection of antibodies to the antigen in human sera. *Proc Natll Acad Sci USA* 1981;78: 6476-80
- [3] Proietti F, Carneiro-Proietti A, Murphy E et al: Global epidemiology of HTLV-I infection and associated diseases. *Oncogene* 2005;24:6058-68
- [4] Arisawa K, Soda M, Shirahama S et al: Evaluation of adult T-cell leukemia/lymphoma incidence and its impact on non-Hodgkin lymphoma incidence in southwestern Japan. *Int J Cancer* 2000;85:319-24
- [5] Shimoyama M: Diagnostic criteria and classification of clinical subtypes of adult T-cell leukaemia-lymphoma. A report from the Lymphoma Study Group (1984-87). *British J Haematol* 1991;79:428-37
- [6] Katsuya H, Ishitsuka K, Tamura K et al: Treatment and survival among 1594 patients with ATLL diagnosed in the 2000s. *Blood* 2015;126:2570-7
- [7] Matsuoka M: Human T-cell leukemia virus type I and adult T-cell leukemia. *Oncogene* 1991;22:5131-40
- [8] Yamagishi M, Watanabe T: Molecular hallmarks of adult T cell leukemia. *Front*

Microbiol2012;3:334

- [9] Yamada Y, Hatta Y, Tomonaga M et al: Deletions of p15 and/or p16 genes as a poor-prognosis factor in adult T-cell leukemia. *Clinical Oncol* 1997;15:1778-85
- [10] Nagai H, Kinoshita T, Shimoyama M, et al: Genetic alteration of p53 in some patients with adult T-cell leukemia. *Jpn J Cancer Res* 1991;82:1421-7
- [11] Hatta Y, Yamada Y, Koeffler HP et al: Extensive analysis of the retinoblastoma gene in adult T cell leukemia/lymphoma (ATLL). *Leukemia* 1997;11:984-9
- [12] Tamiya S, Etoh K, Matsuoka M et al: Mutation of CD95 (Fas/Apo-1) gene in adult T-cell leukemia cells. *Blood* 1998;91:3935-42
- [13] Oshiro A, Tagawa H, Seto M et al: Identification of subtype-specific genomic alterations in aggressive adult T-cell leukemia/lymphoma. *Blood* 2006;107:4500-4507
- [14] Imaizumi Y, Murota H, Matsuyama T et al: Expression of the c-Met proto-oncogene and its possible involvement in liver invasion in adult T-cell leukemia. *Clinical Cancer Res* 2003;9:181-7.
- [15] Choi Y.L, Tsukasaki K, Mano H et al: A genomic analysis of adult T-cell leukemia. *Oncogene* 2007;26:1245-55.
- [16] Nosaka K, Maeda M, Matsuoka M et al: Increasing methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. *Cancer Res* 2000;60:1043-8
- [17] Taniguchi A, Y. Nemoto Y, Daibata M et al: Promoter methylation of the bone

morphogenetic protein-6 gene in association with adult T-cell leukemia, *Int J Cancer* 2008; 123:1824-31

[18] Yamada O, Ozaki K, Kawauchi K et al: JAK-STAT and JAK-PI3K-mTORC1 pathways regulate telomerase transcriptionally and posttranslationally in ATLL cells, *Mol Cancer Ther* 2012;11:1112-21

[19] Yamagishi M, Nakano K, Watanabe T et al: Polycomb-mediated loss of miR-31 activates NIK-dependent NF-kappaB pathway in adult T cell leukemia and other cancers. *Cancer Cell* 2012;21:121-35

[20] Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-7

[21] Sugihara E, Saya E: Complexity of cancer stem cells. *Int J Cancer* 2013;132:1249-59

[22] Ito M, Hiramatsu H, Nakahata T et al: NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood* 2002;100:3175-82

[23] Suzuki M, Takahashi T, Sugamura K et al: Induction of human humoral immune responses in a novel HLA-DR expressing transgenic NOD/Shi-scid/ $\gamma$  cnull (NOG) mouse. *Int Immunol* 2012;24:243-52

[24] Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Yamazaki T et al: LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* 2012;30:2631-44

- [25] Imai T, Tamai K, Tanaka N et al: CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. PloS ONE 2013;8:e62002
- [26] Tamai K, Nakamura M, Tanaka N et al: Suppressive expression of CD274 increases tumorigenesis and cancer stem cell phenotypes in cholangiocarcinoma. Cancer Sci 2014;105:667-74
- [27] Matsuda Y, Yoshimura H, Ishiwata T et al: Nestin delineates pancreatic cancer stem cells in metastatic foci of NOD/Shi-scid IL2Rgamma(null) (NOG) mice. Am J Pathol 2014;184:674-85
- [28] Dewan MZ, Terashima K, Yamamoto N et al: Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammapac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. Virol 2003;77:5286-94
- [29] Yamazaki J, Mizukami T, Yamaguchi K et al: Identification of cancer stem cells in a Tax-transgenic (Tax-Tg) mouse model of adult T-cell leukemia/lymphoma. Blood 2009;114:2709-20
- [30] Kayo H, Yamazaki H, Morimoto C et al: Stem cell properties and the side population cells as a target for interferon-alpha in adult T-cell leukemia/lymphoma. Biochem Biophys Res Commun 2007;364:808-14.
- [31] Chagan-Yasutan H, Tsukasaki K, Hattori T et al: Involvement of osteopontin and its signaling molecule CD44 in clinicopathological features of adult T cell leukemia. Leuk Res

2011;35:1484–90

[32] Miyatake Y, Sheehy N, Kasahara M et al: Anchorage-dependent multicellular aggregate formation induces CD44 high cancer stem cell-like ATLL cells in an NF- $\kappa$ B- and vimentin-dependent manner. *Cancer Lett* 2015;357:355–63

[33] Nagai Y, Kawahara M, Takaori-Kondo A et al: T memory stem cells are the hierarchical apex of adult T-cell leukemia. *Blood* 2015;125:3527–35

[34] Yamada Y, Sugahara K, Kamihira S et al: Fas-resistance in ATLL cell lines not associated with HTLV-I or FAP-1 production. *Cancer Lett* 1999;147:215–9.

[35] Sugamura K, Fujii M, Hinuma Y et al: Cell surface phenotypes and expression of viral antigens of various human cell lines carrying human T-cell leukemia virus. *Int J Cancer* 1984;34:221–8

[36] Breitling R, Armengaud P, Herzyk P et al: Rank products: a simple, yet powerful, new method to detect differentially regulated genes in replicated microarray experiments. *FEBS Lett* 2004;573:83–92

[37] Alterio V, Hilvob M, Simonea GD et al: Crystal structure of the catalytic domain of the tumor-associated human carbonic anhydrase IX. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:16233–8.

[38] Liang Z, Xue Y, Lindskog S et al: Importance of the conserved active-site residues Tyr7, Glu106 and Thr199 for the catalytic function of human carbonic anhydrase II. *Eur J Biochem*

1993;211:821–7

[39] Swietach P, Hulikova A, Harris AL et al: New insights into the physiological role of carbonic anhydrase IX in tumour pH regulation. *Oncogene* 2010;29:6509–21

[40] Robertson N, Potter C, Harris AL et al: Role of carbonic anhydrase IX in human tumor cell growth, survival, and invasion. *Cancer Res* 2004;64:6160–5

[41] Radvak P, Repic M, Kopacek J et al: Suppression of carbonic anhydrase IX leads to aberrant focal adhesion and decreased invasion of tumor cells. *Oncol Rep* 2013;29:1147–53

[42] Csaderova L, Debreova M, Svastova E et al: The effect of carbonic anhydrase IX on focal contacts during cell spreading and migration. *Front Physiol* 2013;4:271

[43] Zatovicova M, Sedlakova O, Pastorekova S et al: Ectodomain shedding of the hypoxia-induced carbonic anhydrase IX is a metalloprotease-dependent process regulated by TACE/ADAM17. *Br J Cancer* 2005;93:1267–76.

[44] Georgina N. Masoud, Wei Li: HIF-1  $\alpha$  pathway: role, regulation and intervention for cancer therapy. *Acta Pharm Sin B* 2015;5:378–89

[45] Shukla S, Pia Patric IR, Somasundaram K et al: A DNA methylation prognostic signature of glioblastoma: identification of NPTX2-PTEN-NF- $\kappa$ B nexus. *Cancer Res* 2013;73:6563–73

[46] Tille JC, Ho L, Citi S et al: The Expression of the Zonula Adhaerens

Protein PLEKHA7 Is Strongly Decreased in High Grade Ductal and Lobular Breast Carcinomas. PLoS One 2015;10:e0135442.

[47] King R, Weilbaecher KN, Fisher DE et al: Microphthalmia transcription factor. A sensitive and specific melanocyte marker for Melanoma Diagnosis. Am J Pathol 1999;155:731-8

[48] Chen J, Jaeger K, Roop DR et al: Mice expressing a mutant Krt75 (K6hf) allele develop hair and nail defects resembling pachyonychia congenital. J Invest Dermatol 2008;128:270-9

[49] Okroj M, Holmquist E, Blom AM et al: Local expression of complement factor I in breast cancer cells correlates with poor survival and recurrence. Cancer Immunol Immunother 2015;64:467-78

[50] Riihilä P, Nissinen L, Kähäri VM et al: Complement factor I promotes progression of cutaneous squamous cell carcinoma. J Invest Dermatol 2015;135:579-88

[51] LeBleu VS, O'Connell JT, Kalluri R et al: PGC-1  $\alpha$  mediates mitochondrial biogenesis and oxidative phosphorylation in cancer cells to promote metastasis. Nat Cell Biol 2014;16:992-1003

[52] Charfi C, Edouard E, Rassart E: Identification of GPM6A and GPM6B as potential new human lymphoidogene. Cellular Oncol 2014;37:179-91



- [53] Gregory TK, Wald D, Tse W et al: Molecular prognostic markers for adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *J Hematol Oncol* 2009;2:23
- [54] Ivanov S, Liao SY, Stanbridge EJ et al: Expression of Hypoxia-Inducible Cell-Surface Transmembrane Carbonic Anhydrases in Human Cancer. *Am J Pathol* 2001;158:905-19
- [55] Luong-Player A, Liu H, Wang HL, Lin F:  
Immunohistochemical reevaluation of carbonic anhydrase IX (CA IX) expression in tumors and normal tissues. *Am J Clin Pathol* 2014;141:219-25
- [56] Simone G, Supuran CT: Carbonic anhydrase IX: Biochemical and crystallographic characterization of a novel antitumor target, *Biochim. Biophys Acta* 2010;1804:404-9.
- [57] Chen LQ, Howison CM, Baker AF et al: Assessment of carbonic anhydrase IX expression and extracellular pH in B-cell lymphoma cell line models. *Leuk Lymphoma* 2015;56:1432-39
- [58] Lounnas N, Rosilio C, Imbert V et al: Pharmacological inhibition of carbonic anhydrase XII interferes with cell proliferation and induces cell apoptosis in T-cell Hypoxia-inducible expression of tumor-associated carbonic anhydrases. *Cancer Lett* 2013;333:76-88
- [59] Innocenti A, Pastorekova S, Supuran CT et al: The proteoglycan region of the tumor-associated carbonic anhydrase isoform IX acts as an intrinsic buffer optimizing  $\text{CO}_2$  hydration at acidic pH values characteristic of solid tumors. *Bioorg Med Chem Lett*

2009;19:5825–8

[60] Kaluz S, Kaluzová M, Stanbridge EJ et al: Transcriptional control of the tumor- and hypoxia-marker carbonic anhydrase 9: a one transcription factor (HIF-1) show?. *Biochim Biophys Acta* 2009;1795:162-72

[61] Wang G, Cheng Z, Li F et al: CREB is a key negative regulator of carbonic anhydrase IX (CA9) in gastric cancer. *Cell Signal* 2015;27:1369–79

[62] Nakamura J, Kitajima Y, Miyazaki K et al: Expression of hypoxic marker CA IX is regulated by site-specific DNA methylation and is associated with the histology of gastric cancer. *Am J Pathol* 2011;178:515–24

## 10. 表

表 1

遺伝子発現レトロウイルスベクター

実験目的	遺伝子発現ベクター	導入細胞
ST1-CA9 <sup>high</sup> 細胞における CA9 knockdown	shCA9-1: CA9 に対する shRNA	ST1-CA9 <sup>high</sup> /shCA9-1
	shCA9-2: CA9 に対する shRNA	ST1-CA9 <sup>high</sup> /shCA9-2
	empty vector	ST1-CA9 <sup>high</sup> /SIREN
ST1 細胞における CA9 発現	CA9wt: 野生型 CA9	ST1/CA9wt
	empty vector	ST1/pMXsΔEco
ST1 細胞における CA9 変異遺伝子発現	CA9ΔPG: プロテオグリカン領域 欠失変異 CA9	ST1/CA9ΔPG
	CA9ΔIC: 細胞内領域欠失変異 CA9	ST1/CA9ΔIC
	CA9mt : 酵素活性部位点変異 CA9	ST1/CA9mt
	empty vector	ST1/pMXsΔEco
TL-Om1 細胞における CA9 発現	CA9wt: 野生型 CA9	TL-Om1/CA9wt
	empty vector	TL-Om1/pMXsΔEco

表2. ATLL リンパ腫型検体の患者プロフィール

症例	年齢	性別	原発巣	組織	治療方法と奏効度	転帰	観察期間
ATLL-A	77	F	頸部リンパ節	リンパ節	THP-COP3 コース→PD	死亡	4 ヶ月
ATLL -B	49	M	腹腔リンパ節	リンパ節	同種造血幹細胞移植	生存	6 年以上
ATLL -C	77	M	頸部リンパ節	リンパ節	不明	死亡	不明
ATLL -D	41	M	頸部リンパ節	リンパ節	CHOP6 コースにて CR→再発	死亡	10 ヶ月
ATLL -E	57	F	肝臓	リンパ節	CHOP6 コースにて CR→再発→救援療法→PD	死亡	16 ヶ月
ATLL -F	78	M	頸部リンパ節	リンパ節	不明	不明	不明

## 11. 図の説明

### 図1 ST1-N6 における CA9 の発現亢進

(A) ST1 株細胞(それぞれ独立に採取した4つのサンプル)ならびに ST1 亜株(ST1-N6, -N7, -N8, -N9)細胞の遺伝子発現をマイクロアレイにて解析した. ST1 細胞と比較して, 全ての亜株細胞で高い発現を示した上位 20 遺伝子を発現の差が大きい順にヒートマップで示した.

(B) ST1 ならびに ST1-N6~N9 の細胞表面の CA9 発現をフローサイトメトリーにて測定し, CA9 陽性細胞の比率(%)で示した. 3 回以上同じ実験を行い, 同様の結果を確認したのち, 代表的な図を示した.

### 図2 CA9 の分子構造

CA9 分子構造を示す. CA9 は主として細胞膜上に存在し, 二量体を形成する. N 末端より順にプロテオグリカン領域, 酵素活性領域, 膜貫通領域, および細胞内領域を有する.

### 図3 ST1 細胞ならびに ST1 亜株細胞における CA9 の発現

(A) 親 ST1 株細胞ならびに亜株(ST1-CA9<sup>high</sup> および ST1-CA9<sup>low</sup>)細胞における CA9 発現をフローサイトメトリーにて測定し, CA9 陽性細胞の比率(%)を示した. 3 回以上同じ実験を行い, 同様の結果を確認した. (B) ST1 株細胞ならびに亜株(ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup>, ST1-N6)細胞における CA9 発現をウエスタンブロットにて検出した. (C) 定量 RT-PCR による CA9 mRNA の発現. ST1 株細胞ならびに亜株(ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup>, ST1-N6)細胞に発現する CA9 mRNA を RT-PCR にて測定した. (D) ELISA 法による細胞培養上清中の CA9

の定量. ST1株細胞ならびに亜株(ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup>, ST1-N6)細胞の培養上清中の CA9 量を ELISA 法にて測定した.

#### 図4 ST1 株および亜株細胞の造腫瘍性

(A) ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup> および ST1 の各細胞( $1 \times 10^6$  個)を NOG マウスの皮下6箇所 にそれぞれ注射し, 経時的に腫瘍径を計測し, それらの平均値をプロットした. エラーバー に信頼区間(信頼水準 95%)を示した. (B) 移植後8週目の腫瘍組織を摘出し, トリプシンで 処理し, 得られた細胞をフラスコにて24時間培養後, CA9 発現をフローサイトメリーにて解 析し(実線), 移植前細胞(点線)と比較した. 2回同じ実験を行い, 同様の結果を確認し た.(C)移植前後の各細胞(ST1, ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup>)についてウエスタンブロットにて CA9 蛋白を検出し比較した. 移植後の細胞は移植後8週間の腫瘍を摘出し用いた. ST1-N6 を陽性コントロールとして用いた.

#### 図5 ST1 株および亜株細胞の *in vitro* 増殖能

(A) ST1 株およびその亜株(ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup>)細胞の *in vitro* での増殖能を比較し た. ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞と ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞を培養し, 経時的にトリパンブルー染色にて生細胞数をカウントした. (B)嫌気性チャンバー内での ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞と ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞の増殖能を比較した. O<sub>2</sub> 濃度 1%の嫌気性チャンバー内で ST1 細胞, ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞, ST1-CA9<sup>low</sup> 細胞を培養し, 経時的に生細胞数をカウントした.

## 図6 CA9 の発現抑制による ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞の造腫瘍性の低下

(A) ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞に CA9 に対する 2 種類の shRNA (shCA9-1 and shCA9-2) 発現ベクターならびに空ベクター(SIREN)を挿入し, puromycin にて shRNA 発現細胞を選択し, フローサイトメトリーにより CA9 発現を解析した. 2 回同じ実験を行い, 同様の結果を確認した. (B)ウエスタンブロットにより各細胞の CA9 発現を解析した. (C) shRNA 導入 ST1-CA9<sup>high</sup> 細胞( $1 \times 10^4$  個)を等量のマトリゲルと混和後, NOG マウスの皮下左右 2 箇所ずつにそれぞれ 6 か所移植し, 経時的に腫瘍径を計測し, それらの平均値をプロットした. エラーバーにて信頼区間(信頼水準 95%)を示した.

## 図7 野生型ならびに変異型 CA9 遺伝子導入による造腫瘍性の変化

(A) ST1 細胞に野生型 CA9 発現ベクター (CA9wt)および空ベクター(pMXs  $\Delta$  Eco)を導入し, CA9 発現をフローサイトメトリーにて調べた. (B)ウエスタンブロットにより各遺伝子導入細胞の CA9 発現を調べた. (C) CA9wt 遺伝子を導入した ST1 細胞(ST1/CA9wt) および ST1-CA9<sup>high</sup>細胞をそれぞれ  $1 \times 10^4$  個ずつマトリゲルと混和後, NOG マウスに皮下移植し, 造腫瘍性を比較した. \*印は ST1/pMX  $\Delta$  Eco と ST1/CA9wt 間において t 検定での有意差があることを示す. (D) ST1 細胞に変異型 CA9 発現ベクター (CA9  $\Delta$  PG, CA9  $\Delta$  IC, CA9mt), CA9wt, および pMXs  $\Delta$  Eco を導入し, フローサイトメトリーにて CA9 発現を調べた. (E) 各細胞の CA9 量をウエスタンブロットにて調べた. (F)遺伝子導入を行った ST1/CA9mt, ST1/CA9  $\Delta$  PG, ST1/CA9  $\Delta$  IC, ST1/CA9wt 細胞, および ST1/ pMXs  $\Delta$  Eco 細胞をそれぞ

れ  $1 \times 10^4$  個ずつマトリゲルと混和後, NOG マウスに 6 箇所皮下移植し, 造腫瘍性を比較した. 算出した腫瘍体積の平均値をプロットしエラーバーにて信頼区間(信頼水準 95%)を示した. (G) TL-Om1 細胞に CA9wt および pMXs  $\Delta$ Eco を導入して得られた TL-Om1/CA9wt 細胞, TL-Om1/ pMXs  $\Delta$ Eco 細胞および親 TL-Om1 細胞について, CA9 発現をフローサイトメトリーにて測定し, CA9 陽性細胞の比率(%)を示した. 2 回同じ実験を行い, 同様の結果を確認したうちの一つを示した. (H) TL-Om1/CA9wt, TL-Om1/ pMXs  $\Delta$ Eco 細胞および TL-Om1 の各細胞をそれぞれ  $1 \times 10^2$  個ずつマトリゲルと混和後, NOG マウスに 6 箇所皮下移植し, 造腫瘍性を比較した. 算出した腫瘍体積の平均値をプロットしエラーバーにて信頼区間(信頼水準 95%)を示した.

#### 図8 ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup> および ST1 細胞における CD44 ならびに CD45RA の発現

(A) ST1 細胞を ヒト CD44 抗体で免疫染色し, フローサイトメトリーにて陽性細胞の比率を測定した. さらに, CD44<sup>high</sup> 細胞と CD44<sup>low</sup> 細胞をそれぞれ分画した. 分画した ST1-CD44<sup>high</sup> 細胞と ST1-CD44<sup>low</sup> 細胞ならびに ST1 細胞をそれぞれ  $1 \times 10^4$  個ずつマトリゲルと混和後, NOG マウスに皮下移植し, 造腫瘍性を比較した. 算出した腫瘍体積の平均値をプロットしエラーバーにて信頼区間(信頼水準 95%)を示した. 2 回同じ実験を試行し同様の結果を確認した後, 代表的なものを示した.

(B) ST1-CA9<sup>high</sup>, ST1-CA9<sup>low</sup> および ST1 細胞をヒト CD45RA 抗体で免疫染色し, フローサイトメトリーにて陽性細胞の比率を測定した. 2 回実験を行い, 代表的なものを示した.



### 図9 リンパ腫型 ATLL 症例検体における CA9 陽性細胞の検出

リンパ腫型 ATLL の6症例(表2)から得られたリンパ節組織検体を用いて, ATLL がん細胞に発現する CD4 と共に CA9 の免疫染色を行い, 共焦点顕微鏡を用いて解析した. これらの症例の中で二重染色像が得られた2症例(ATLL-A and ATLL-B)を示した.

### 図10 急性型 ATLL 症例検体における CA9 陽性細胞の検出と血清中 CA9 の測定

(A) 急性型 ATLL の3症例(ATLL-1, ATLL-2, ATLL-7)および健常人ドナー2名(HD-1 and HD-2)より末梢血単核球(PBMCs)を採取し, フローサイトメトリーにて CA9, CD4, CD25 の発現を調べた. ヒストグラム上 Isotype control 全集団よりも蛍光強度が高いものを陽性とした. 全体の細胞における CD4<sup>+</sup>CA9<sup>+</sup>細胞を%で示した. (B)急性型 ATLL の6症例(ATLL1~6)および健常人ドナー3名 (HD1~3)の末梢血液から得られた血清中の CA9をELISA法にて測定した.

12. ☒

☒1

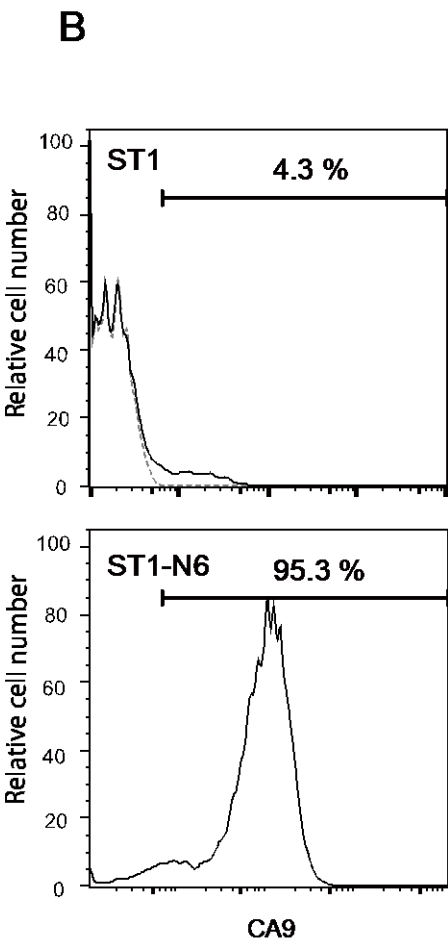
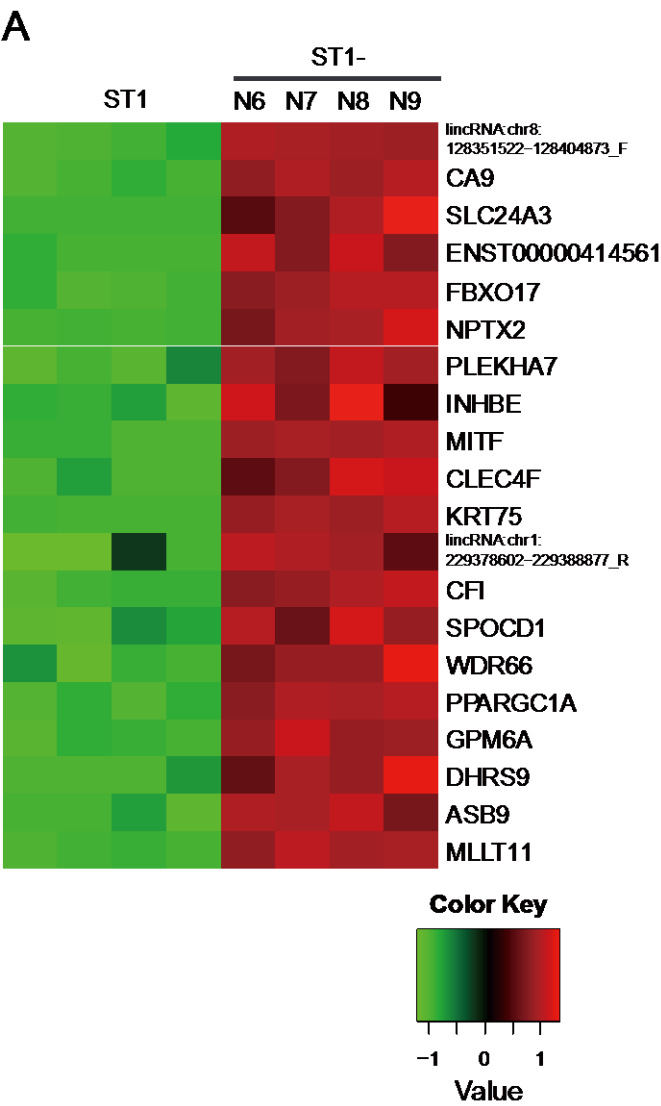


図2

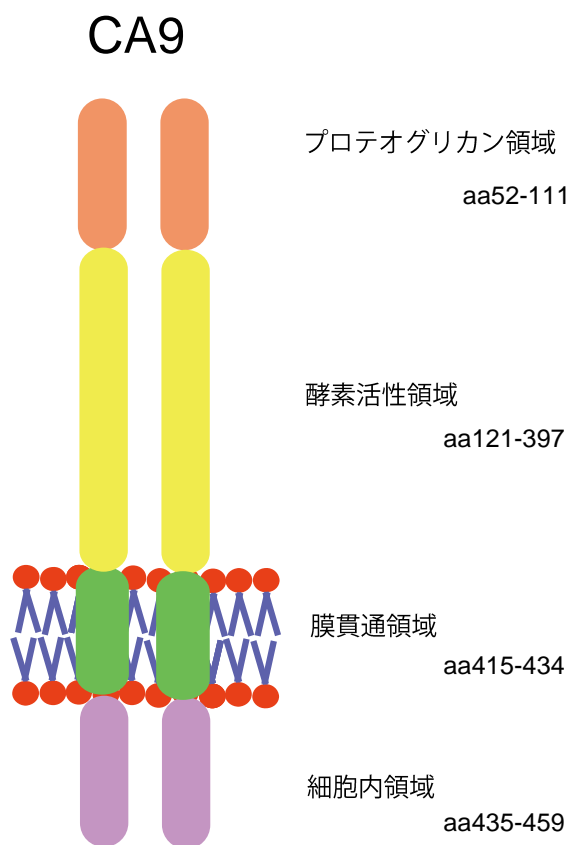
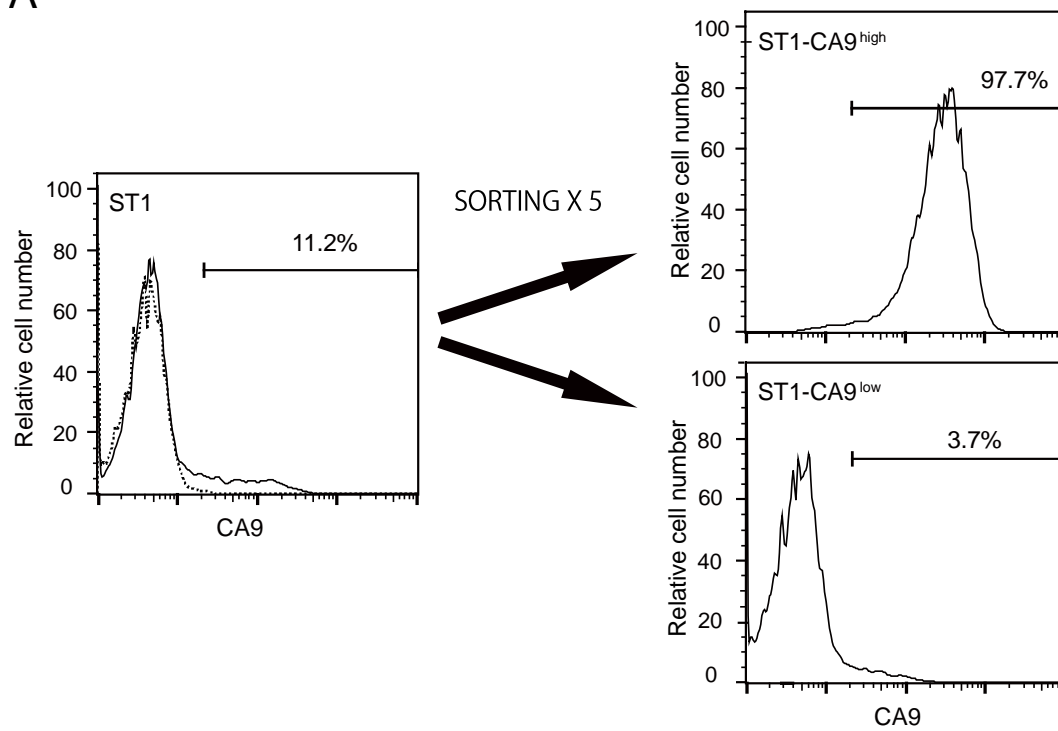
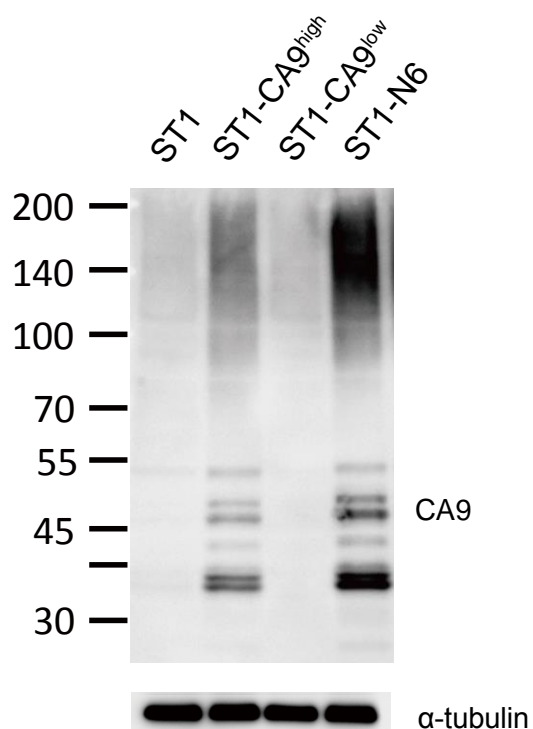


Figure 3

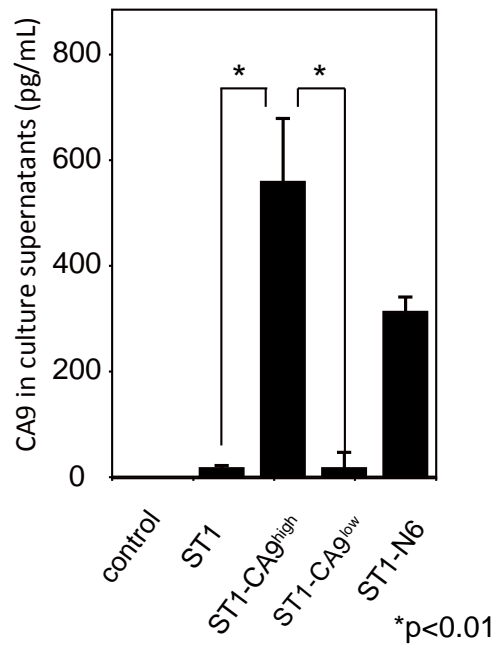
A



B



C



D

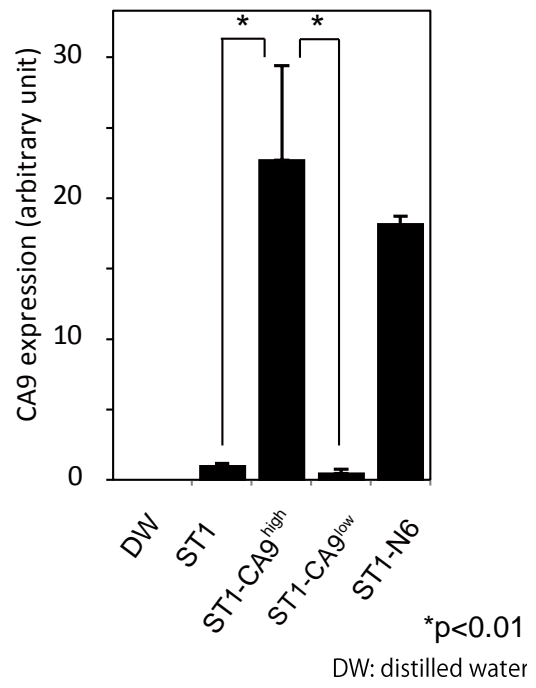
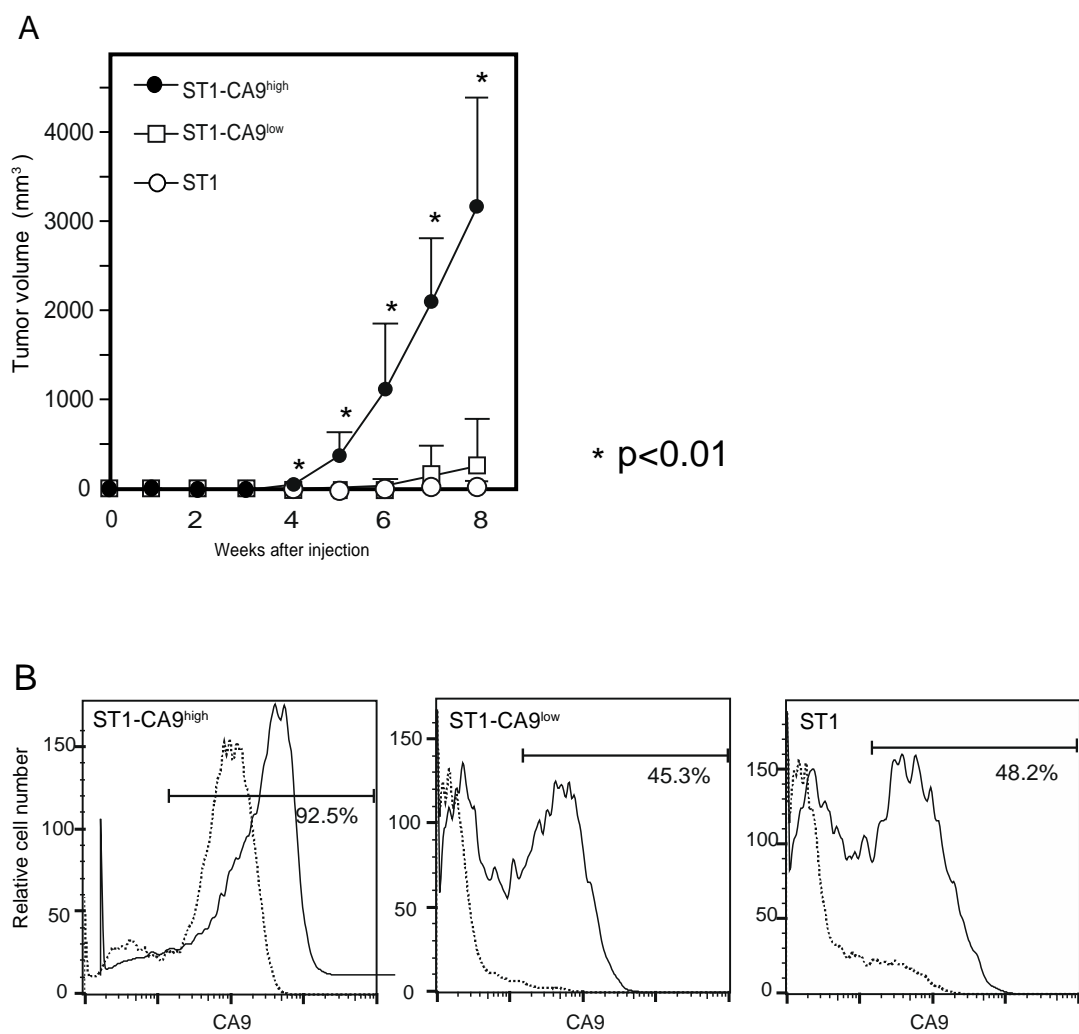


Figure 4



C

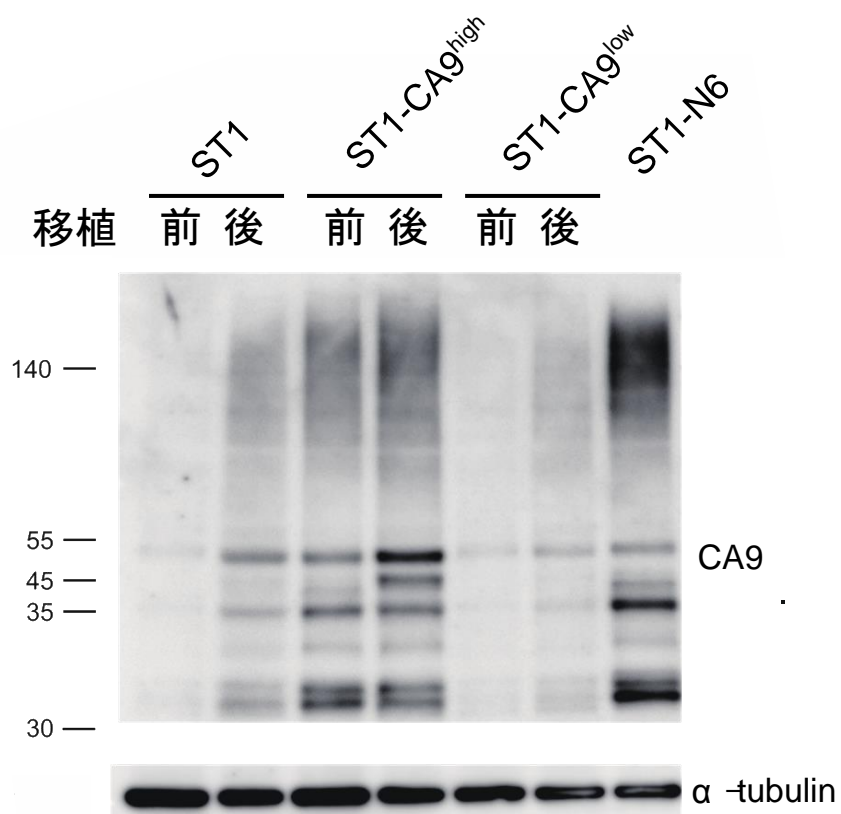
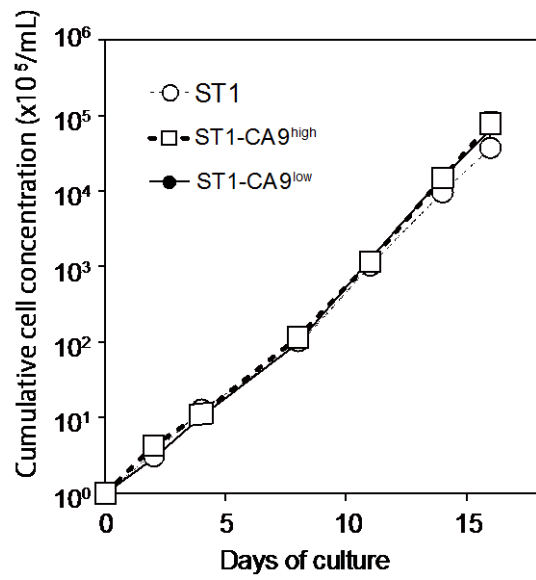
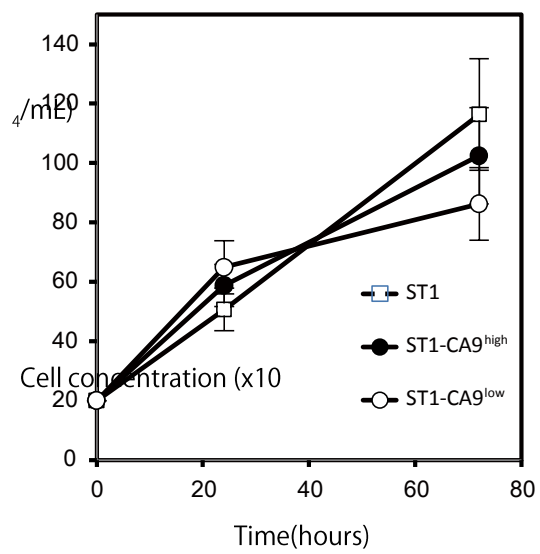


Figure 5

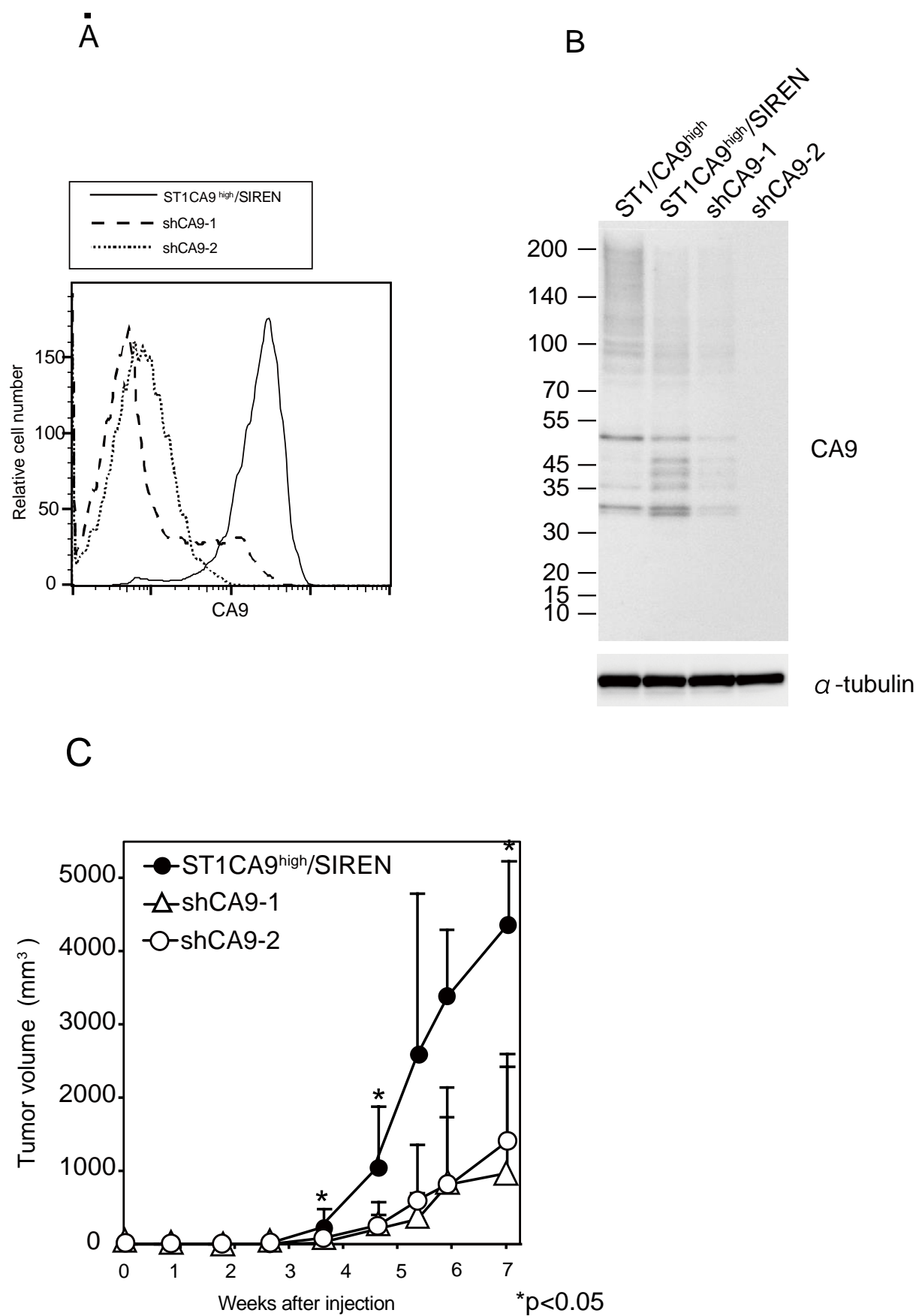
A

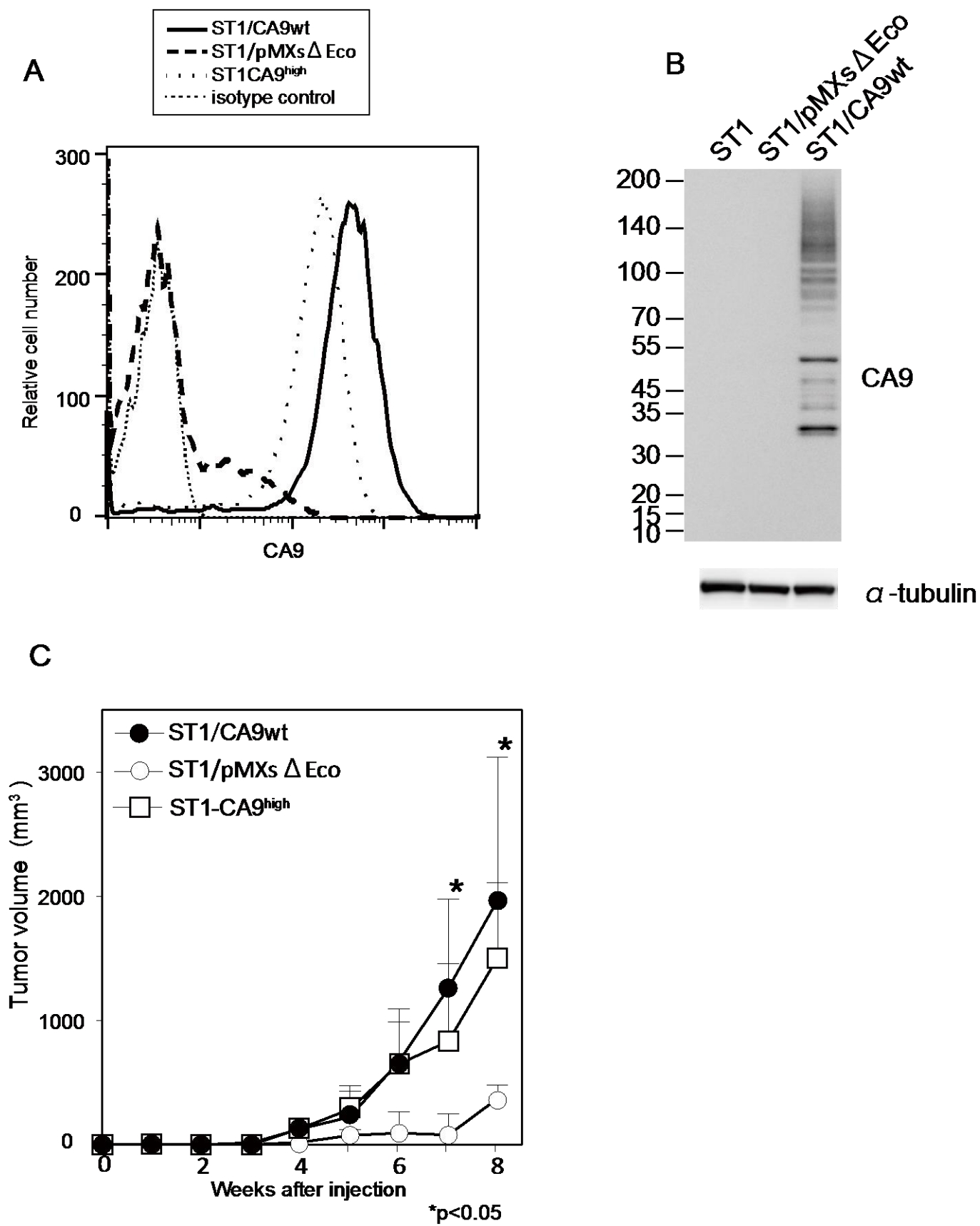


B

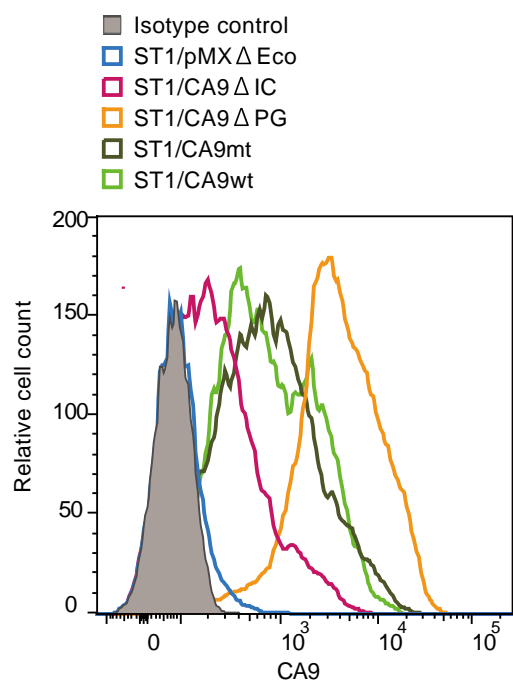




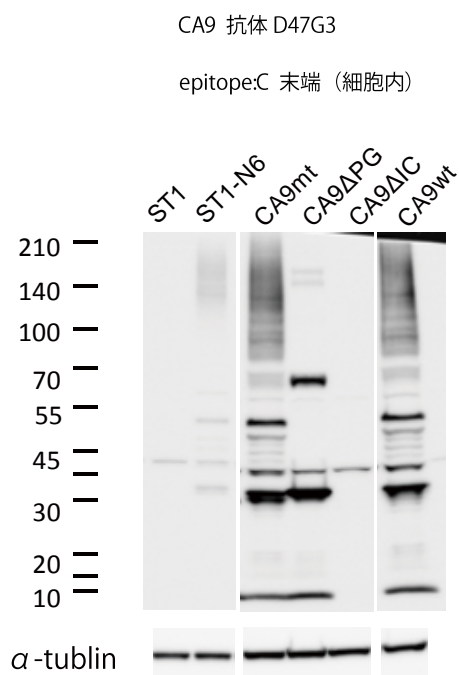
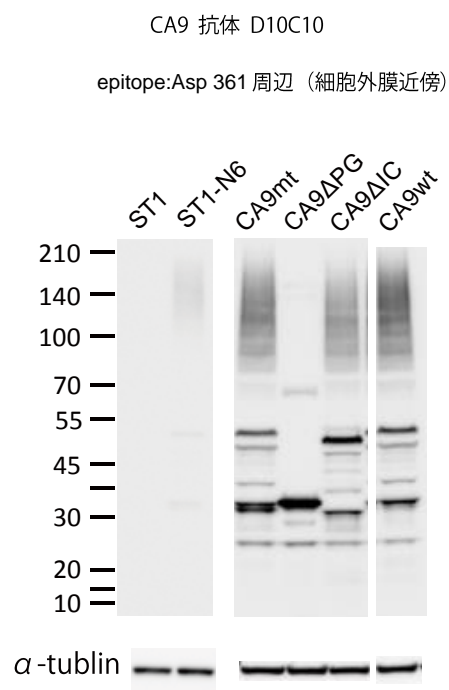




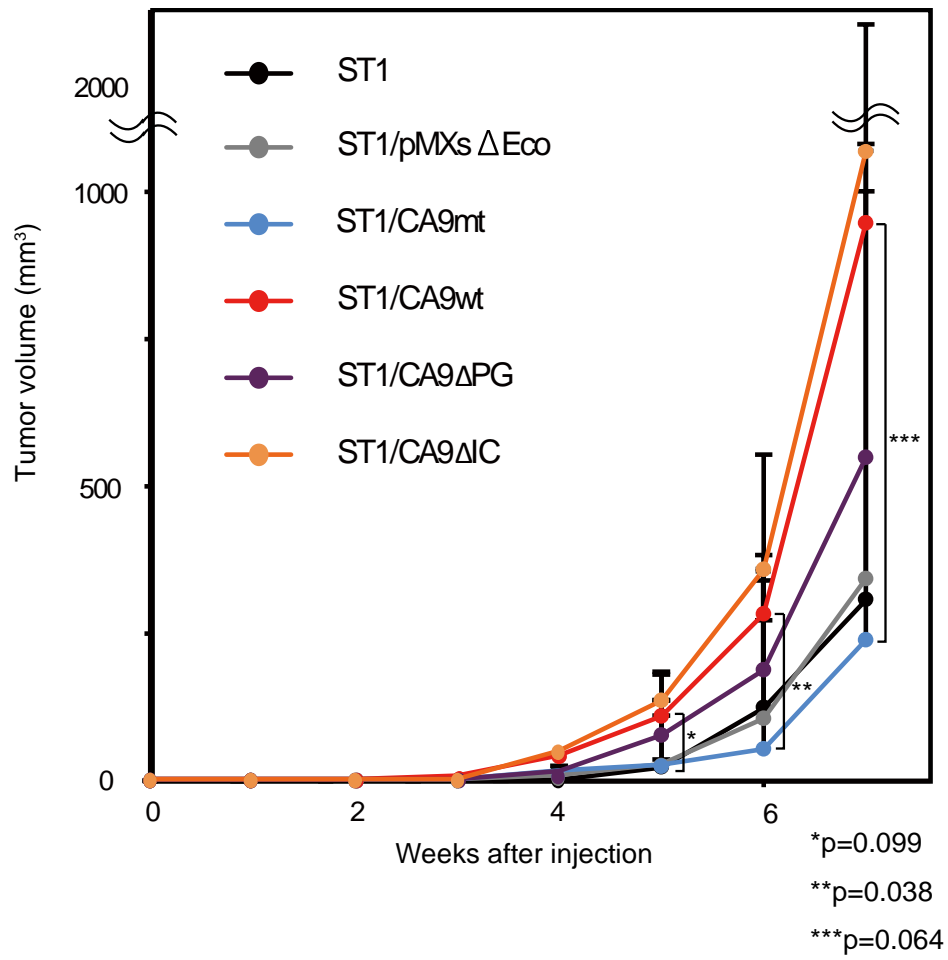
D



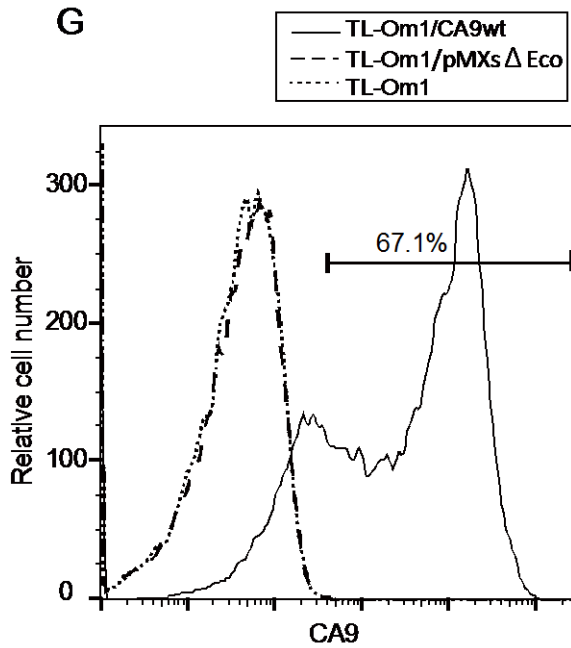
E



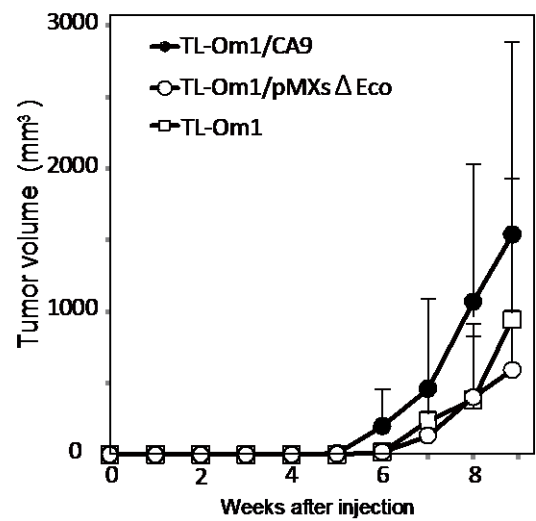
F



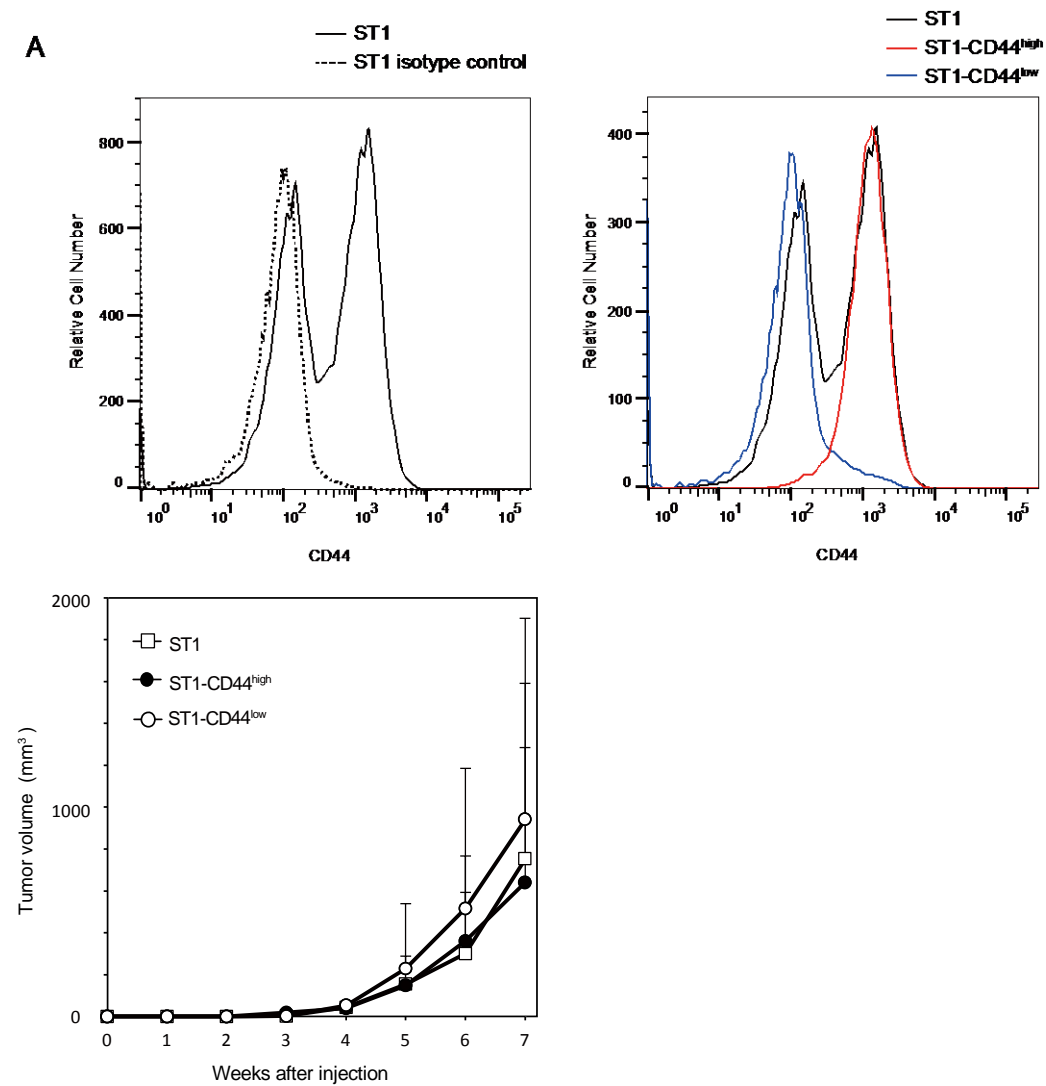
G



H



A



B

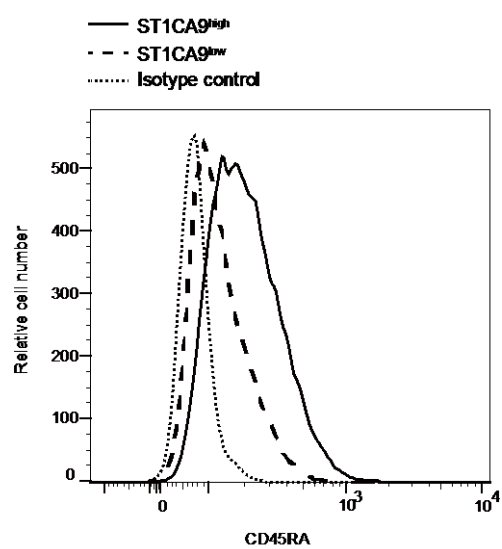
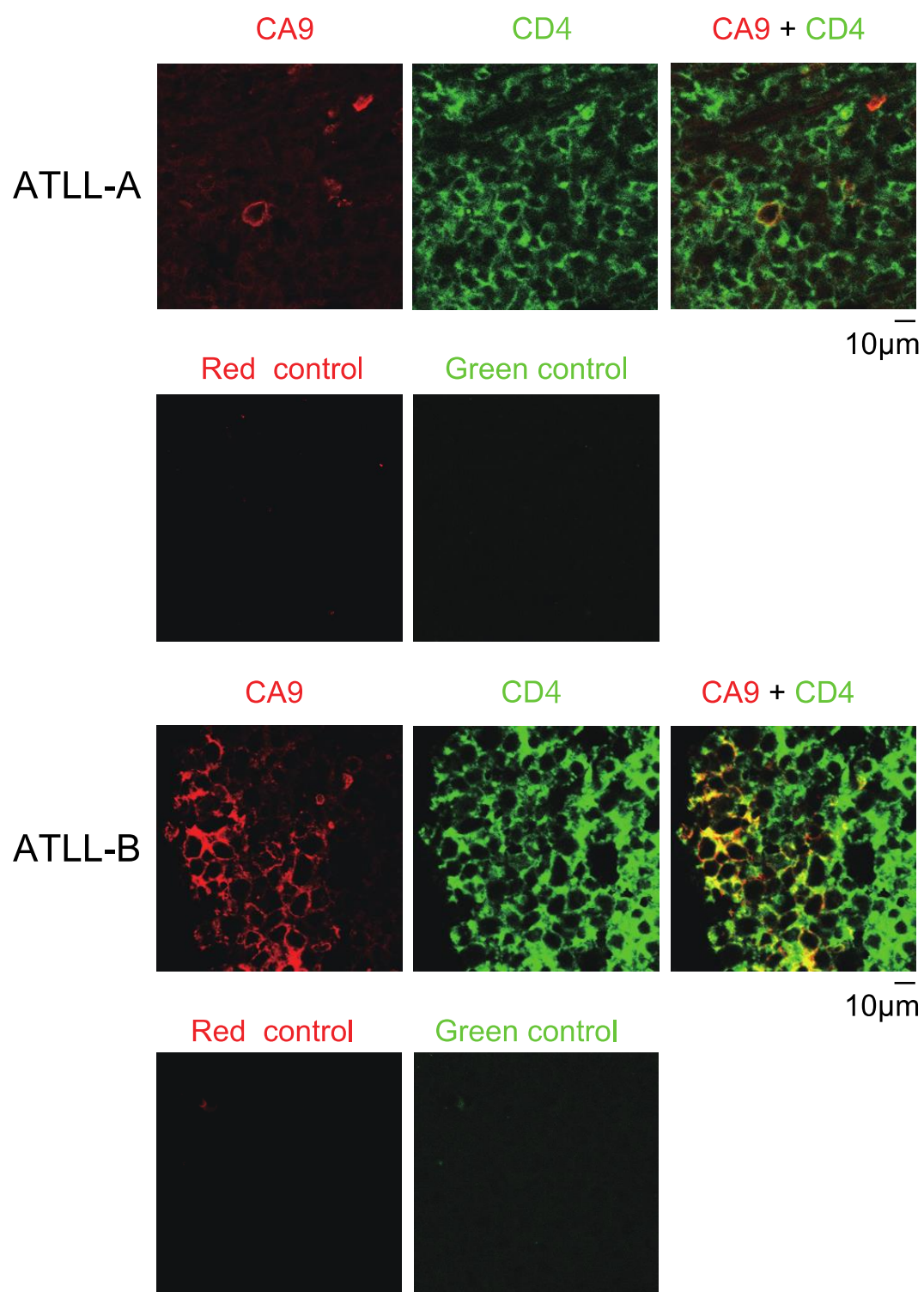
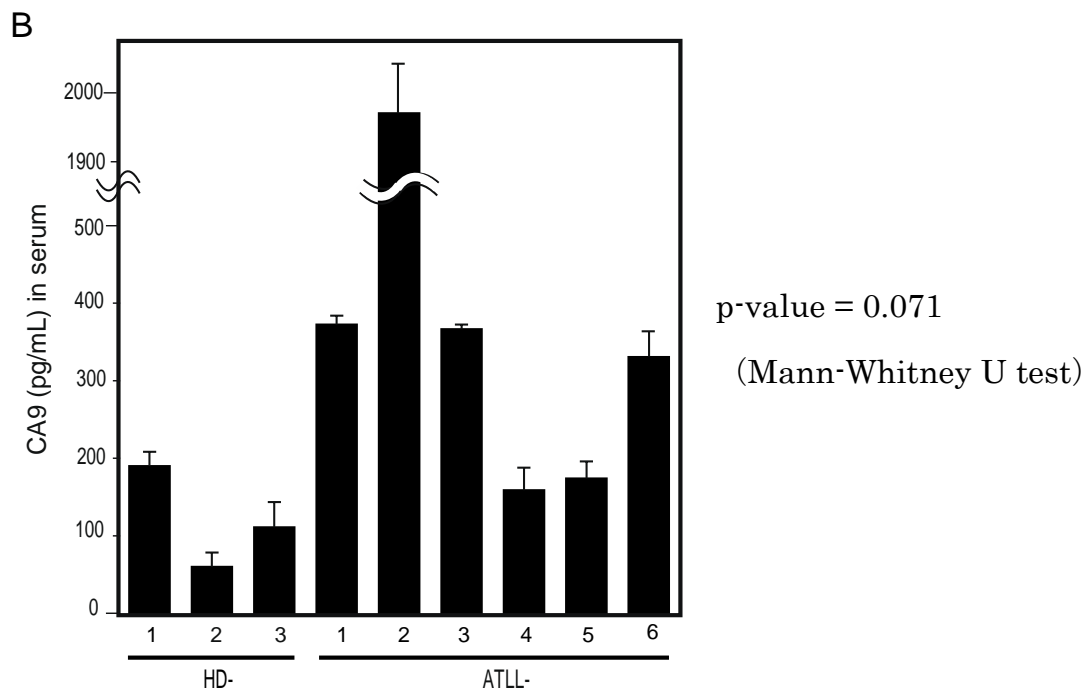
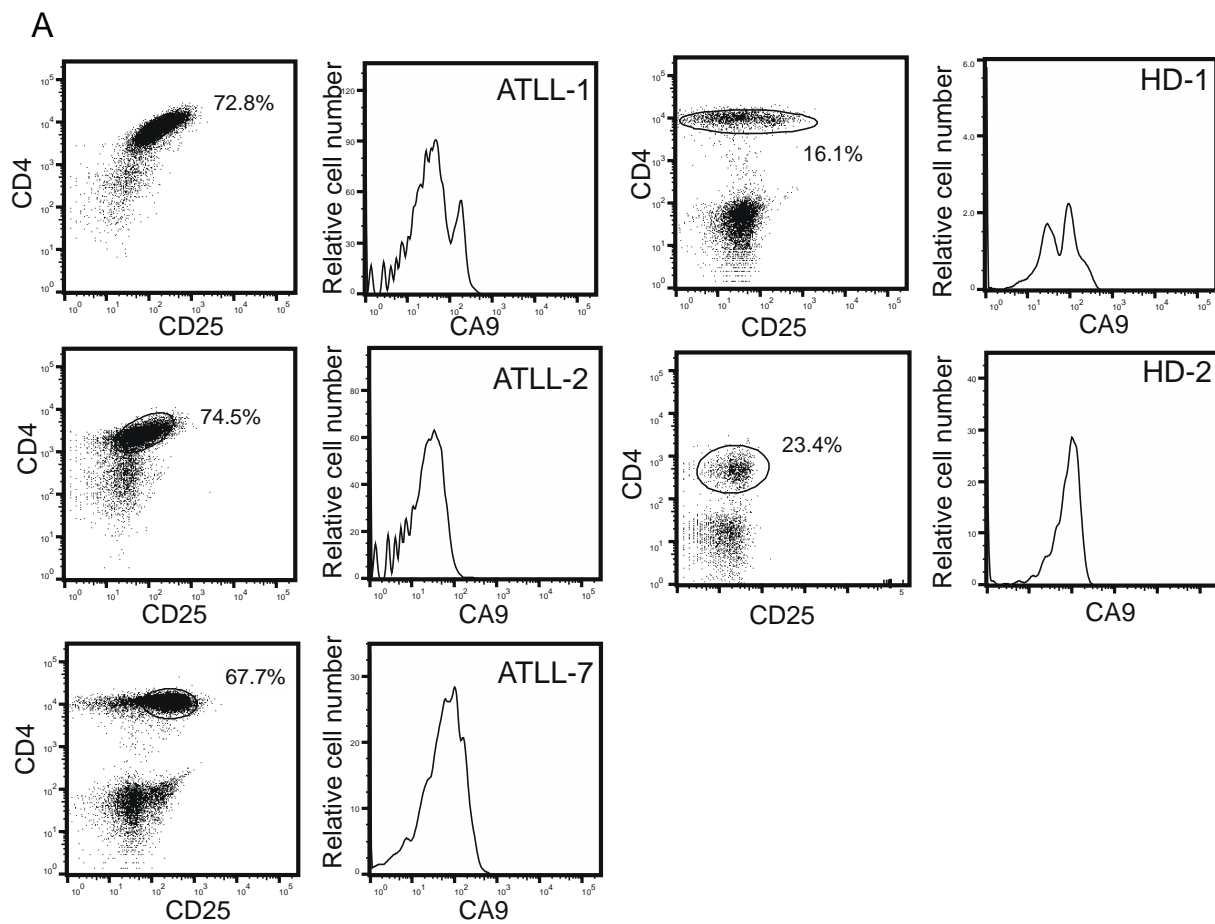


図9





### 13. 基礎論文

Nasu K, Yamaguchi K, Takanashi T, Tamai K, Sato I, Ine S, Sasaki O, Satoh K, Tanaka N, Tanaka Y, Fukushima T, Harigae H, and Sugamura K.

Carbonic anhydrase IX promotes the tumorigenicity of adult T-cell leukemia-derived cells in immunodeficient NOG mice (投稿中)



## 14. 謝辞

本論文の提出にあたり、本研究の機会を与えて頂き、御指導を賜りました張替秀郎先生（東北大学大学院医学系研究科血液・免疫病学分野教授）に厚く御礼申し上げます。また、研究を遂行するにあたり、宮城県立がんセンター研究所に温かく迎え入れてくださり、実験の方向性、実験方法、結果の統合、論文作成に至るまで明示頂き、大変丁寧な御指導を賜りました山口壹範、菅村和夫両先生（宮城県立がんセンター研究所／発がん制御部門）に心より感謝致します。今回の実験に要した細胞株 ST1 をご供与いただいた長崎大学の山田恭輝先生に感謝いたします。また、臨床検体の収集および取り扱いにご助力いただいた宮城県立がんセンター血液内科の佐々木治先生、琉球大学の田中勇悦先生、福島卓也先生、仙台医療センターの井根省二先生、目黒邦昭先生、東北大学病理部の方々、宮城県がんセンター病理部の方々に感謝いたします。宮城県がんセンター研究所の諸先生方、研究員、スタッフの方々にも、様々な実験背景や知識を共有でき、実験を行いやすい環境の中取り組ませて頂いたことに感謝いたします。特に、研究を手伝っていただいた高梨友花さん、病理標本の所見についてご教授いただいた宮城県がんセンター病理部の佐藤郁郎先生、マイクロアレイの解析をはじめ実験上の諸問題につきご教示くださった宮城県がんセンターの玉井恵一先生に感謝いたします。また、アドバイザー教員として有用なアドバイスを頂きました加藤恭丈先生（東北大学大学院医学系研究科医科学専攻生物化学分野）に感謝いたします。多くの先生方の御指導の下、恵まれた環境で本研究テーマに取り組めましたことは大変有意義であり、多くのことを学ばせて頂きました。深謝いたします。